

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 7 月 5 日 (05.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/48151 A1

(51) 国際特許分類: **C12N 5/06**,
5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, 33/44, A61P
9/06, 9/04 // A61K 38/18, C12N 15/12

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09323

(22) 国際出願日: 2000 年 12 月 27 日 (27.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/372826
1999 年 12 月 28 日 (28.12.1999) JP
特願平 PCT/JP00/01148
2000 年 2 月 28 日 (28.02.2000) JP
特願平 PCT/JP00/07741
2000 年 11 月 2 日 (02.11.2000) JP

(71) 出願人: 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO
KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田
区大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 梅澤明弘 (UMEZAWA, Akihiro); 〒270-0014
千葉県松戸市小金 316 Chiba (JP). 秦 順一 (HATA,
Jun-ichi); 〒141-0031 東京都品川区西五反田 2-13-10
Tokyo (JP). 福田恵一 (FUKUDA, Keiichi); 〒176-0006
東京都練馬区栄町 3-2 Tokyo (JP). 小川 聡 (OGAWA,

Satoshi); 〒157-0066 東京都世田谷区成城 5-12-15
Tokyo (JP). 桜田一洋 (SAKURADA, Kazuhiro). 山田
陽史 (YAMADA, Yoji); 〒194-8533 東京都町田市旭町
3 丁目 6 番 6 号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内
Tokyo (JP). 五條理志 (GOJO, Satoshi); 〒350-0414 埼
玉県入間郡越生町越生東 2-7-3-303 Saitama (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELLS CAPABLE OF DIFFERENTIATING INTO HEART MUSCLE CELLS

(54) 発明の名称: 心筋細胞への分化能を有する細胞

(57) Abstract: Methods of isolating, purifying, culturing and differentiation-inducing cells which are capable of differentiating into heart muscle cells; a method of proliferating cells which are capable of differentiating into heart muscle cells and a method of regulating the differentiation thereof into heart muscle cells by using various cytokines, transcriptional factors, etc.; a method of acquiring a surface antigen specific to cells which are capable of differentiating into heart muscle cells; a method of acquiring a gene encoding this surface antigen; a method of acquiring an antibody specific to the above surface antigen; a method of acquiring a protein and a gene participating in the proliferation of cells which are capable of differentiating into heart muscle cells and differentiation thereof into heart muscle cells; remedies for various heart diseases with the use of cells which are capable of differentiating into heart muscle cells; and a method of inducing the differentiation of various cells (nerve cells, liver cells, fat cells, skeletal muscle cells, vascular endothelial cells, osteoblasts, etc.) and tissues by using cells which are capable of differentiating into heart muscle cells.

[続葉有]



WO 01/48151 A1



(57) 要約:

本発明は、心筋細胞への分化能を有する細胞の単離、精製、培養、分化誘導法に関する。また本発明は、各種サイトカイン、転写因子などを用いた、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖方法および心筋細胞への分化を制御する方法に関する。本発明はさらに、心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な表面抗原の取得方法、該表面抗原をコードする遺伝子の取得方法、該表面抗原特異的な抗体の取得方法、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖および心筋細胞への分化に関与する蛋白質および遺伝子の取得方法に関する。本発明はまた、心筋細胞への分化能を有する細胞を用いた各種心臓疾患の治療薬に関する。本発明はさらに心筋細胞への分化能を有する細胞を用いて、神経系細胞、肝細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞など様々な細胞、組織を分化誘導する方法に関する。

明 細 書

心筋細胞への分化能を有する細胞

技術分野

本発明は、心筋細胞への分化能を有する細胞の単離、精製、培養、分化誘導法に関する。また本発明は、各種サイトカイン、転写因子などを用いた、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖方法および心筋細胞への分化を制御する方法に関する。本発明はさらに、心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な表面抗原の取得方法、該表面抗原をコードする遺伝子の取得方法、該表面抗原特異的な抗体の取得方法、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖および心筋細胞への分化に関与する蛋白質および遺伝子の取得方法に関する。本発明はまた、心筋細胞への分化能を有する細胞を用いた各種心臓疾患の治療薬に関する。

背景技術

心筋細胞は、出生前は自律拍動しながら活発に細胞分裂を行っている。しかし、出生と同時にその分裂能は喪失し、肝細胞のように再び細胞分裂能を獲得することはなく、また骨格筋細胞とも異なり衛星細胞といった未分化な前駆細胞を持つこともない。従って、心筋梗塞、心筋炎または老化等に伴い心筋細胞が壊死すると、生体内では残存心筋細胞の細胞分裂ではなく細胞の肥大がおきる。心肥大は初期においては生理的適応であるが、また共存する心線維芽細胞の増殖による間質の線維化と相まって心臓自体の拡張機能の低下、さらには収縮機能の低下へと結びつき心不全を呈するようになる。心筋梗塞等による心不全のこれまでの治療は心収縮力の増強、血管拡張薬による心臓の圧負荷・容量負荷の軽減、利尿薬による血流量の減少等の対症療法を中心に行われてきた。これに対し、心臓移植は重症心不全に対する根本的な治療法であるが、臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費の高騰等の問題から心臓移植が一般的な医療に普及するのは簡単ではない。実際、心臓病は我が国の死亡原因の第3位となっており(厚生白書平成10年)、失われた心筋細胞を再生することができれば医療福祉の大きな前進につながると考えられる。

現在までに、心筋細胞の性質を保存した細胞株としては、心房性ナトリウム利尿ホルモン

のプロモーターに SV40 の large T 抗原を組み換えて作製したトランスジェニックマウスの心房に生じた腫瘍から株化された AT-1 細胞があげられる[Science, 239; 1029-1038 (1988)]。しかしながら、該細胞は in vivo に移植すると腫瘍を形成するため、細胞移植には適さないという問題がある。そこで、このような背景のもと、心筋を再構築するため以下の方法が考えられた。

1つ目の方法は、心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に変換する方法である。これは、線維芽細胞に MyoD を導入すると骨格筋細胞に変換できることから類推された。これまでに、マウスの胎児性癌細胞である P19 細胞での成功例は示されているものの[Cell Struc. & Func., 21: 101-110 (1996)]、非ガン細胞での成功例は報告されていない。

2つ目の方法は、心筋細胞に再び分裂能を付与する方法である。これは、胎児期に心筋が拍動しながら分裂できる現象に基づいている。しかしながら、これまでに成功例は報告されていない。

3つ目の方法は、未分化な幹細胞から心筋細胞を誘導する方法である。すでに、胚性幹細胞 (ES 細胞) から心筋細胞を誘導できることが示されているが、胚性幹細胞自身を成体に移植するとカルシノーマを形成すること、抗原性などの問題が存在する[Nature Biotechnology, 17, 139-142 (1999)]。

従って、胚性幹細胞を現実の医療へと応用するためには、少なくとも心筋前駆細胞あるいは、心筋細胞を純粋に精製する技術が不可欠である。抗原性の問題はクローン化の技術により解決できる可能性は示唆されているが、煩雑な操作を必要とすることから一般的な医療への応用は容易ではない。

中絶胎児から未分化な細胞である心筋前駆細胞を取得して移植に用いる方法も考えられており、動物を用いた実験では心筋細胞として有効に機能することが知られている[Science, 264, 98-101 (1994)]。しかしながら、この方法で大量の心筋前駆細胞を取得することは困難であり、倫理の観点からも一般的な医療への応用は容易ではない。

成体骨髄には造血系幹細胞および血管幹細胞以外に間葉系幹細胞が存在し、間葉系幹細胞からは骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、靱帯細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、ストローマ細胞、肝臓 oval 細胞が分化誘導できることが報告されている[Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。一方、最近、マウス成体の骨髄から取得した細

胞から、心筋細胞が分化誘導できることを見い出した[J. Clinical Investigation, 103, 10-18 (1999)]。該報告は患者自身から骨髓液を取得して、in vitro で細胞培養および薬剤処理を行った後に、心臓の障害部位へ移植する細胞治療が現実的な医療として可能になることを示唆している[J. Clinical Investigation, 103, 591-592 (1999)]。しかしながら、該報告は、成体マウスの骨髓から樹立した不死化細胞の一部が心筋細胞に分化できることを示したものにすぎない。また、成体骨髓中の心筋細胞に分化する能力を有する細胞の特性の同定、該細胞を増殖する方法、該細胞から効率的に心筋細胞に分化誘導する方法については明らかでなかった[J. Clinical Investigation, 103, 591-592 (1999)]。

生体内の組織から目的の細胞を取得する方法として、各種表面抗原を認識する抗体が用いられている。例えば、未熟な造血幹細胞では CD34+/CD38-/HLA-DR-/CD90(Thy-1)+の特性を有していること、また、造血幹細胞が分化するに従い、CD38 が発現し CD90(Thy-1)が消失することが知られている[蛋白質核酸酵素 Vol. 45, No13, 2056-2062(2000)]。血管内皮細胞では、CD 34、CD 31、Flk-1、Tie-2、E-セレクトリン等のマーカーを発現しており[分子心血管病Vol. 1, No. 3, 294-302 (2000)]、骨髓の間葉系幹細胞では CD 90、CD 105、CD 140等のマーカーを発現している[Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。しかしながら、心筋や血管内皮細胞を誘導できる幹細胞の表面マーカーについては明らかにされていない。

発明の開示

現在の心疾患治療より安全かつ確実な治療が望まれている。そこで、骨髓細胞などの生体組織または臍帯血より心筋細胞への分化能を有する細胞を選別し、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖または分化をコントロールすることは、骨髓由来の細胞などの生体細胞または臍帯血を用いた心筋の再生治療の開発に有用である。そのために、心筋細胞への分化能を有する細胞を単離して、該細胞の増殖または分化に働くサイトカインまたは転写因子を同定することが必要である。

本発明者は上記問題点を開発すべく鋭意研究し、以下の結果を得た。すなわち、マウス骨髓由来の細胞を1細胞レベルにまず分離を行い、多数の細胞株を取得した。これら細胞株を一つ一つ、5-アザシチジン処理を行うことで心筋形成能を有する細胞株を複数取得

した。次に選られた細胞株を、GFP(Green Fluorescent Protein)を発現するレトロウイルスベクターを用いて標識し、1つの細胞を蛍光顕微鏡下で追跡することで、骨髓由来の細胞が、心筋細胞および脂肪細胞の少なくとも2種類の異なる細胞を分化誘導できる多分化能(Purulipotent)を持った幹細胞であることを見出した。さらに、該幹細胞は5-アザシチジンだけでなく、DMSO(dimethyl sulfoxide)などの他のゲノムDNAの脱メチル化剤の投与によっても、確率的(stochastic)に心筋細胞、脂肪細胞および骨格筋細胞の系列に分化することを見出し、ゲノムDNAの脱メチル化が骨髓由来の細胞からの心筋細胞への分化誘導に有効であることを明らかにした。またFGF-8, ET1, Midkine, BMP4の4種類のうち少なくとも一種のサイトカインと5-アザシチジンとを組み合わせることで骨髓由来の細胞に心筋特異的な遺伝子であるANP(atrial natriuretic peptide)およびcTnI(cardiac Troponin I)の発現を促進できることを見出した。同様にNkx2.5およびGATA4の2種類の転写因子をウイルスベクターを用いて骨髓由来細胞に強制発現を行った後、5-アザシチジン処理を行うことで、心筋細胞への分化が約50倍促進できることを見出した。また骨髓由来の細胞を心筋細胞の細胞外基質をコートした培養皿で培養することで、骨髓由来の細胞に心筋特異的な遺伝子であるANPおよびcTnIの発現を特異的に促進できることを見出した。さらに、骨髓由来の細胞を心筋由来の初代培養細胞と共培養を行うことで骨髓由来の細胞から心筋の形成が約10倍促進することを見出した。また、Nkx2.5, GATA4の2種類の転写因子をウイルスベクターを用いて骨髓由来細胞に強制発現させることと、心筋細胞との共培養を組み合わせることで、約500倍心筋への分化が促進することを見出した。

次に移植実験により、骨髓由来の細胞の分化能力を検討した。まずマウス成体心臓に移植することで、骨髓由来の細胞が心筋と血管に分化することを見出した。さらに成体マウスの筋肉に移植することで骨格筋を形成できることを見出した。またマウス胚盤胞に移植すると、誕生したマウスの中枢神経系、肝臓、心臓で移植した細胞由来の組織が形成された。中枢神経系は外胚葉系、肝臓は内胚葉系、心臓は中胚葉系の組織である。

これらの結果は、本発明で見出した骨髓由来の細胞が、今まで知られていた骨髓に存在する造血系組織にのみ分化する造血幹細胞および骨格筋、脂肪細胞、骨などの沿軸中胚葉系組織にのみ分化する間葉系幹細胞とは異なる性質、すなわち外胚葉系、中胚葉系および内胚葉系の3胚葉すべてに分化できる全能性を有していることを示している。

また、本発明の骨髄由来の細胞を造血系細胞の表面抗原であるCD 34、CD 117、CD 14、CD 45、CD 90、Sca-1、Ly6c、Ly6gを認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原であるFlk-1、CD 31、CD 105、CD 144を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原であるCD 140を認識する抗体、インテグリンの表面抗原であるCD 49b、CD 49d、CD 29、CD 41を認識する抗体、マトリックス受容体であるCD 54、CD 102、CD 106、CD 44を認識する抗体などを用いて骨髄由来の細胞の表面抗原の発現を解析することにより、今までに知られていない全く新しい発現形態を示している全能性の幹細胞であることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の(1)～(91)を提供するものである。

- (1) 生体組織または臍帯血から単離され、少なくとも心筋細胞に分化する能力を有する細胞。
- (2) 生体組織が骨髄である、上記(1)記載の細胞。
- (3) 細胞が、多分化能幹細胞であることを特徴とする、上記(1)または(2)記載の細胞。
- (4) 細胞が、少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の細胞。
- (5) 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(4)のいずれか1項に記載の細胞。
- (6) 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の細胞。
- (7) 細胞が、成体組織のいかなる細胞にも分化する能力を有する全能性幹細胞であることを特徴とする、上記(1)～(3)記載の細胞。
- (8) 細胞がCD 117陽性およびCD 140陽性である、上記(1)～(7)のいずれか1項に記載の細胞。
- (9) 細胞が、さらにCD 34陽性である、上記(8)記載の細胞。
- (10) 細胞が、さらにCD 144陽性である、上記(9)記載の細胞。

- (11) 細胞が、さらに CD 144陰性である、上記(9)記載の細胞。
- (12) 細胞が、CD 34陰性である、上記(8)記載の細胞。
- (13) 細胞が、さらに CD 144陽性である、上記(12)記載の細胞。
- (14) 細胞が、さらに CD 144陰性である、上記(12)記載の細胞。
- (15) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(10)記載の細胞。
- (16) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(11)記載の細胞。
- (17) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(12)記載の細胞。
- (18) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(13)記載の細胞。
- (19) Hoechst 33342を取り込まない、上記(1)記載の細胞。
- (20) 上記(1)～(19)のいずれか1項に細胞から誘導される心筋細胞のみに分化誘導される心筋前駆細胞。
- (21) 心室筋細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (22) 洞結節細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (23) 生体組織または臍帯血がほ乳動物由来のものである、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (24) ほ乳動物がマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サルおよびヒトから選ばれる1種である、上記(23)記載の細胞。
- (25) 細胞が、マウス骨髄由来多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)である、上記

(1)～(8)のいずれか1項に記載の細胞。

(26) 染色体 DNA の脱メチル化により心筋細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(25)のいずれか1項に記載の細胞。

(27) 染色体 DNA の脱メチル化が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびジメチルスルフォキシド(DMSO)からなる群から選ばれる少なくとも1種によるものであることを特徴とする、上記(26)記載の細胞。

(28) デメチラーゼが、配列番号1記載で表されるアミノ酸配列を有するデメチラーゼである、上記(27)記載の細胞。

(29) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子により心筋細胞への分化が促進される上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(30) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(29)記載の細胞。

(31) サイトカインが血小板由来増殖因子(PDGF)、繊維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(32) PDGF が配列番号3または5で表されるアミノ酸配列、FGF-8 が配列番号64で表されるアミノ酸配列、ET1 が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(31)記載の細胞。

(33) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(34) ビタミンがレチノイン酸である、上記(30)記載の細胞。

(35) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(36) Nkx2)5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表さ

れるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(35)記載の細胞。

(37) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(30)記載の細胞。

(38) 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)により心筋細胞への分化が抑制される上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(39) FGF-2 が配列番号7または8記載のアミノ酸配列を有する FGF-2 である、上記(38)記載の細胞。

(40) 心臓に移植することにより心筋細胞または血管に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(41) 胚盤胞に移植すること、または心筋細胞と共培養を行うことにより、心筋に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(42) 核内受容体 PPAR- γ を活性化因子により脂肪細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(43) 核内受容体 PPAR- γ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする上記(42)記載の細胞。

(44) チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(43)記載の細胞。

(45) 胚盤胞に移植すること、または脳または脊髄に移植することにより、神経系細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(46) 胚盤胞に移植すること、または肝臓に移植することにより、肝細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(47) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の

細胞から心筋を形成する方法。

(48) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、上記(9)記載の細胞から上記(12)記載の細胞へ脱分化させる方法。

(49) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、CD 117陰性および CD 140陽性の細胞から上記(8)記載の細胞へ脱分化させる方法。

(50) 染色体 DNA の脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(48)および(49)記載の方法。

(51) デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、上記(50)記載の方法。

(52) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を用いることを特徴とする、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞から心筋を形成する方法。

(53) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(52)記載の方法。

(54) サイトカインが PDGF、繊維芽細胞増殖因子8 (FGF-8)、エンドセリン1 (ET1)、ミドカイン (Midkine) および骨形成因子4 (BMP-4) からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(55) PDGF が配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8 が配列番号64のアミノ酸配列、ET1 が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4 が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(54)記載の方法。

(56) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(57) ビタミンがレチノイン酸である、上記(53)記載の方法。

(58) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、

dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(59) Nkx2)5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表されるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有する、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(58)記載の方法。

(60) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(53)記載の方法。

(61) 核内受容体 PPAR- γ を活性化する因子を用いることを特徴とする、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞から脂肪細胞を分化させる方法。

(62) 核内受容体 PPAR- γ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする上記(61)記載の方法。

(63) チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(62)記載の方法。

(64) 染色体DNAの脱メチル化剤を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。

(65) 染色体DNAの脱メチル化剤がデメチラーゼ、5-アザシチジンおよびDMSOからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(64)記載の心筋形成剤。

(66) デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、上記(65)記載の心筋形成剤。

(67) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を有効成分として含有する心筋形成剤。

(68) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外

基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(67)記載の心筋形成剤。

(69) サイトカインがPDGF、繊維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)、骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(70) PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64のアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(69)記載の心筋形成剤。

(71) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(72) ビタミンがレチノイン酸である、上記(71)記載の心筋形成剤。

(73) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(74) Nkx2)5/Csxが配列番号9記載のアミノ酸配列で表される、GATA4が配列番号11記載のアミノ酸配列、MEF-2Aが配列番号13記載のアミノ酸配列、MEF-2Bが配列番号15記載のアミノ酸配列、MEF-2Cが配列番号17記載のアミノ酸配列、MEF-2Dが配列番号19記載のアミノ酸配列、dHANDが配列番号21記載のアミノ酸配列、eHANDが配列番号23記載のアミノ酸配列、TEF-1が配列番号25記載のアミノ酸配列、TEF-3が配列番号27記載のアミノ酸配列、TEF-5が配列番号29記載のアミノ酸配列、MesP1が配列番号62記載のアミノ酸配列でそれぞれ表される、上記(73)記載の心筋形成剤。

(75) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(68)記載の心筋形成剤。

(76) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、心臓疾患により破壊された心臓を再生する方法。

(77) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分とする心臓再生薬。

(78) 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された

上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子を心筋へ特異的に輸送する方法。

(79) 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

(80) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を免疫原として用いることを特徴とする、該細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

(81) 上記(80)記載の方法で取得された抗体を用いることを特徴とする、上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法。

(82) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞に特異的な表面抗原を取得する方法。

(83) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法。

(84) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞の心筋細胞への分化を誘導する因子をスクリーニングする方法。

(85) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を不死化する因子をスクリーニングする方法。

(86) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞にテロメラーゼを発現させることを特徴とする、該細胞の不死化方法。

(87) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(86)記載の方法。

(88) テロメラーゼを発現させることにより、不死化させた上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

(89) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(88)記載の治療薬。

(90) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を含んだ培養上清。

(91) 上記(90)記載の培養上清を用いることを特徴とする、上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞としては、骨髄、筋肉、脳、脾臓、肝臓、腎臓などの成体組織または臍帯血から単離することが可能であるが、好ましくは骨髄または臍帯血があげられる。

本発明の多分化能幹細胞としては、心筋細胞とそれ以外の細胞に分化する能力を有する細胞であればいかなる細胞でもよい。好ましくは少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する細胞、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する細胞、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する細胞などがあげられる。

また、本来は脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞に分化能を有する細胞であって、心筋細胞への分化する能力を有さない細胞であっても、後述する誘導方法等により心筋細胞へと分化する能力を付与される細胞であれば、本発明に包含される。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞があげられる。CD117 陽性および CD140 陽性である細胞としては、好ましくは CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、より好ましくは CD144 陽性、CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陰性、CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陽性、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陰性、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、さらに好ましくは CD 34陽性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陽性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞、CD 34陽性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陰性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞、CD 34陰性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陽性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞、CD 34陰性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、F

Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陰性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞があげられる。CD117 陽性および CD140 陽性である細胞としては、マウス骨髄由来多分化能間細胞である BMSC があげられる。マウス骨髄由来多分化能幹細胞 BMSC は、平成12年2月22日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に FERM BP-7043 として寄託されている。

本来は脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞に分化能を有する細胞であって、心筋細胞への分化する能力を有さない細胞であっても、後述する誘導方法等により心筋細胞へと分化する能力を付与される細胞としては、CD117 陰性および CD140 陽性である細胞、好ましくは CD144 陰性、CD34 陰性、CD117 陰性および CD140 陽性である細胞、より好ましくは、CD34 陰性、CD117 陰性、CD14 陽性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陽性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陽性、CD102 陰性、CD106 陽性および CD44 陽性である細胞があげられる。CD34 陰性、CD117 陰性、CD14 陽性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陽性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陽性、CD102 陰性、CD106 陽性および CD44 陽性である細胞としては、KUM2 細胞があげられる。

本発明で使用する成体組織または臍帯血の種としては、脊椎動物、好ましくは温血動物、特に好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒトなどの哺乳動物などが用いられる。ヒトの治療用途にはヒト由来であることが好ましい。

上記動物から、成体組織または臍帯血から心筋細胞への分化能を有する細胞を単離し、培養した後に、心筋細胞への分化能を有する細胞を分化、誘導することにより、心筋細胞を得ることができる。

また、本発明の多分化能幹細胞を用いて、心筋細胞だけでなく、血管内皮細胞、平滑筋、骨格筋細胞、脂肪細胞、骨、軟骨、膵内分泌系細胞、膵外分泌系細胞、肝細胞、腎糸球体細胞、腎尿細管細胞、ニューロン、グリア、オリゴデンドロサイトなどへの分化を誘導することにより、各種細胞を得ることができる。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 心筋細胞への分化能を有する細胞の単離

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、成体組織または臍帯血など心筋細胞への分化能を有する細胞を取得することが可能な組織であればいかなる組織からでも単離することができる。以下に、骨髄から心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を単離する方法を述べる。

(1) 骨髄から心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を単離する方法

ヒトの骨髄より心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を取得する方法としては、安全かつ効率的に取得される方法であれば特に限定されないが、S. E. Haynesworth et al. Bone, 13, 81 (1992)に記載された方法に基づき行うことができる。

胸骨または腸骨から骨髄穿刺を行う。骨髄穿刺を行う場所の皮膚面を消毒し、局所麻酔を行う。特に骨膜下を十分に麻酔する。骨髄穿刺針の内筒を抜き、5000units のヘパリンを入れた 10ml 注射器を装着して必要量の骨髄液を速やかに吸引する。平均的には 10ml～20ml の骨髄液を吸引する。骨髄穿刺針を取り外し、10 分間程圧迫止血する。取得した骨髄液を $1,000 \times g$ の遠心分離により骨髄細胞を回収した後、該骨髄細胞を PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄する。本ステップを2回繰り返した後、該骨髄細胞を 10% の FBS (牛胎仔血清) を含む α -MEM (α -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM) あるいは IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium) 等の細胞培養用培地に再浮遊させることにより骨髄細胞液を得ることができる。

該骨髄細胞液から心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を単離する方法としては、溶液中に混在する他の細胞、例えば血球系細胞、造血幹細胞、血管幹細胞および線維芽細胞などを除去できれば特に限定されないが、M. F. Pittenger et al. Science, 284, 143 (1999)に記載された方法に基づき骨髄細胞液を密度 1.073g/ml の percoll に重層した後、 $1,100 \times g$ で 30 分間遠心分離して界面の細胞を回収することにより単離することができる。また、該骨髄細胞液に 10×PBS を加えて 9/10 に希釈した percoll を同容量加えて混合した後、 $20,000 \times g$ で 30 分間遠心分離し、密度 1.075～1.060 の画分を回収することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を含む骨髄細胞混合物を取得することができる。

上記方法により取得した該心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を含む骨髄細胞混

合物は、96 穴の培養プレート各穴に 1 細胞のみが注入されるように希釈して、1 細胞由来のクローンを多数調製した後、以下に記載した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞から心筋細胞を誘導する方法を用いて該クローンを処理し、自律拍動する細胞が出現するクローンを選択することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を得ることができる。

ラットやマウスから心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を取得する方法としては、特に限定されないが以下の手順で取得することができる。ラットあるいはマウスを頸椎脱臼により致死させ、70%エタノールで充分消毒した後、大腿骨の皮膚ならびに大腿四頭筋を切除する。膝関節の部分にハサミをいれて関節をはずし、大腿骨背面の筋肉を除去する。股関節の部分にハサミを入れて関節を外し、大腿骨を取り出す。大腿骨に付着している筋肉をハサミでできるだけ除去した後、大腿骨の両端をハサミで切断する。骨の太さに応じた適当なサイズの針を 2.5ml の注射器に装着し、10%の FBS(牛胎仔血清)を含む α -MEM、DMEM、あるいは IMDM 等の細胞培養用培地約 1.5ml を注射器に充填した後、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込む。注射器内の培養液を骨髄内に注入することで、股関節側の断端から骨髄細胞が押し出される。得られた骨髄細胞はピペッティングにより培養液中に浮遊させる。該骨髄液からは、上記のヒト骨髄液からの骨髄細胞の単離と同様の方法により、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を単離することができる。

(2) 骨髄以外の組織から心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法

後述する 12 に記載の抗体を用いた分離方法により、心筋細胞への分化能を有する細胞を、骨髄以外の組織からも取得することができる。

骨髄以外の組織としては、好ましくは臍帯血があげられる。具体的には、以下の方法で行うことができる。

まず臍帯から臍帯血を分取し、ただちに 500units/ml の終濃度になるようにヘパリンを加える。よく混合した後、遠心分離して臍帯血から細胞を分取し、10%の FBS(牛胎仔血清)を含む α -MEM (α -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM)あるいは IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium)等の細胞培養用培地に再浮遊させる。得られた細胞液から後述する抗体を利用して、心筋細胞への分化能を有する細胞を分離することができる。

2. 心筋細胞への分化能を有する細胞の培養

上記1の方法により単離した、心筋細胞への分化能を有する細胞を培養するために用いる培地としては、通常公知(組織培養の技術基礎編 第三版、朝倉書店 1996)の組成の細胞培養用培地を用いることができるが、好ましくは牛等の血清を5～20%添加した、 α -MEM、DMEM あるいは IMDM 等の細胞培養用培地などが用いられる。培養条件は、細胞が培養可能であればいかなる条件でもよいが、培養温度は 33～37℃が好ましく、さらに 5～10%の二酸化炭素ガスで満たした孵卵器で培養することが好ましい。心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着して増殖することが好ましい。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去して、トリプシン EDTA 溶液を加えることで細胞を浮遊させる。浮遊した細胞は、PBSあるいは該細胞培養用の培地で洗浄後、該細胞培養用の培地で5倍から20倍希釈して新しい培養皿に添加することで、さらに継代培養することができる。

3. 心筋細胞への分化能を有する細胞からの心筋細胞の誘導方法

心筋細胞への分化能を有する細胞より心筋細胞を誘導する方法としては、(1)DNA の脱メチル化剤処理による分化誘導、(2)胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子による分化誘導、(3)心筋細胞への分化能を有する細胞または該細胞から分化した心筋細胞の培養上清による分化誘導などの方法を挙げることができる。これらの方法を単独あるいは組み合わせることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞から心筋細胞を誘導することができる。また、本来、心筋細胞への分化能を有していない間葉系細胞も、これらの方法を用いることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞へと分化し、心筋細胞を誘導することができる。

DNA の脱メチル化剤としては、DNA に対して脱メチル化を引き起こす化合物であればいかなるものでもよい。DNA の脱メチル化剤としては、染色体 DNA 中の GpC 配列中のシトシン残基のメチル化を特異的に阻害する酵素であるデメチラーゼ、5-アザシチジン(以下 5-aza-C と略す)、DMSO (dimethyl sulfoxide)などがあげられる。デメチラーゼとしては、配列番号1記載のアミノ酸配列を有するデメチラーゼ[Nature, 397, 579-583 (1999)]などがあげられる。DNA の脱メチル化剤処理による分化誘導の具体例を以下に示す。

3 μ mol/l から 10 μ mol/l の間の濃度になるように 5-aza-C を心筋細胞への分化能を有

する細胞を含む培地中に添加し、24 時間上記培養条件下でインキュベーションする。培地を交換することで 5-aza-C を除去し、さらに 2～3 週間培養することで心筋細胞を取得することができる。形成される心筋細胞は培養 2～3 週間目では洞結節細胞が中心であるが、培養 4 週間目以降心室型心筋細胞を分化誘導することができる。

胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などをあげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、血小板由来増殖因子(以下、PDGF と略記する。)、線維芽細胞増殖因子 8 (FGF8)、エンドセリン 1 (ET1)、ミドカイン(midkine)、骨形成因子 4 (BMP4)などをあげることができる。PDGF としては PDGF A、PDGF B、PDGF Cなどがあげられ、具体的には配列番号 3 または 5 のアミノ酸配列で表されるものが、線維芽細胞増殖因子 8 (FGF8)としては配列番号 64 のアミノ酸配列で表されるものが、エンドセリン 1 (ET1)としては配列番号 66 のアミノ酸配列で表されるものが、ミドカイン(midkine)としては配列番号 68 のアミノ酸配列で表されるものが、骨形成因子 4 (BMP4)としては配列番号 70 のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。サイトカインは、例えば 10～40ng/ml の濃度で用いられる。

また、心筋細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤を用いることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進することも可能である。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカインとしては、線維芽細胞増殖因子-2 (以下、FGF-2 と略記する。)、具体的には、配列番号 7 または 8 で表される FGF-2 などをあげることができる。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカンに対する阻害剤としては、サイトカインの情報伝達を阻害する物質、例えばサイトカインを中和する抗体、低分子化合物などをあげることができる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。レチノイン酸は、

例えば、 10^{-9} M の濃度で用いられる。

接着分子としては、心臓の発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス蛋白質等があげられる。例えば、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホメオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx (配列番号 9: アミノ酸配列、配列番号 10: 塩基配列)、GATA ファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4 (配列番号 11: アミノ酸配列、配列番号 12: 塩基配列)、myocyte enhancer factor-2 (MEF-2) ファミリーに属する転写因子 MEF-2A (配列番号 13: アミノ酸配列、配列番号 14: 塩基配列)、MEF-2B (配列番号 15: アミノ酸配列、配列番号 16: 塩基配列)、MEF-2C (配列番号 17: アミノ酸配列、配列番号 18: 塩基配列) と MEF-2D (配列番号 19: アミノ酸配列、配列番号 20: 塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND (配列番号 21: アミノ酸配列、配列番号 22: 塩基配列)、eHAND (配列番号 23: アミノ酸配列、配列番号 24: 塩基配列) と MesP1 (配列番号 61: アミノ酸配列、配列番号 62: 塩基配列)、TEA-DNA 結合型転写因子ファミリーに属する TEF-1 (配列番号 25: アミノ酸配列、配列番号 26: 塩基配列)、TEF-3 (配列番号 27: アミノ酸配列、配列番号 28: 塩基配列) と TEF-5 (配列番号 29: アミノ酸配列、配列番号 30: 塩基配列) などをあげることができる。

上述した転写因子は、該因子をコードする DNA を心筋細胞への分化能を有する細胞中に導入し、DNA を発現させることにより心筋細胞への分化を誘導させることができる。

また、自律拍動する心筋細胞から取得した細胞外基質をコートした培養皿を用いて培養すること、自律拍動する心筋細胞と共培養すること、自律拍動する心筋細胞の培養上清を添加することで、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させることができる。

また、4 に示す方法で得られる心筋細胞への分化を誘導する因子 (以下、心筋分化誘導因子と称する) を用いても、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞に分化誘導することができる。

4. 心筋分化誘導因子の取得

心筋分化誘導因子の取得方法としては、自律拍動する細胞の培養上清に各種プロテアーゼ阻害剤を添加して、透析、塩析ならびにクロマトグラフィーなどを組み合わせることにより取得することができる。

さらにマイクロシーケンサーを用いて、上記の心筋分化誘導因子の部分アミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列に基づき設計した DNA プローブを用いて該自律拍動する細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、心筋分化誘導因子の遺伝子を取得することができる。

5. 心筋細胞への分化能を有する細胞を含む心臓再生薬または心臓疾患治療薬

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、心臓再生薬または心臓疾患治療薬として用いることができる。

心臓疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、不整脈、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、弁膜症などをあげることができる。

心臓再生薬としては、心筋細胞への分化能を有する細胞を高純度で含み、心臓の障害部位ならび大きさに応じて、該心筋細胞への分化能を有する細胞を増殖させたもの、好ましくは、心筋細胞への分化能を有する細胞から、心筋内皮細胞(Endocardial endothelial cell)、クッション細胞(Cushion cell)、心室型心筋細胞、心房型心筋細胞、洞結節細胞等の心臓を形成する様々な細胞へ分化誘導できる細胞が用いられる。

これらの薬剤は、心筋梗塞の患者骨髓液中から上述した密度勾配遠心分離法、後述する心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識する抗体を用いたパニング法[J. Immunol., 141(8), 2797-2800 (1988)]あるいは FACS 法[Int. Immunol., 10(3), 275-283 (1998)]、または心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な遺伝子のプロモーターを用いたレポーター系を構築する方法により該心筋細胞への分化能を有する細胞の精製を行うことにより、製造することができる。

また該薬剤には、後述する心筋形成剤を用いて、該心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させた細胞、高齢者の骨髓から取得した骨髓細胞より、後述する不死化方法を利用して細胞分裂能を賦活させた心筋細胞への分化能を有する細胞も含まれる。

上記方法で製造した治療薬は、上記心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識

する抗体とFACS法を組み合わせることで純度を検定することができる。

上記の治療薬を障害部位に輸送する方法としては、カテーテルを利用する方法等が用いられる。以下虚血性心疾患を例に具体的な方法を示す。虚血性心疾患で障害を受けた心筋細胞は、血管狭窄部位の下流に存在することから、上記の細胞を注入する前に、冠動脈造影法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)により血管の狭窄部位を同定しておく必要がある。器質的狭窄病変は狭窄病態に応じて求心性狭窄、偏心性狭窄、多発性壁不整に分類され、特に偏心性狭窄はタイプⅠおよびタイプⅡの2つのタイプに細分類される。狭窄形態は狭心症の経過、予後に関連することが知られており、タイプⅡの偏心性狭窄や多発性壁不整は不安定狭心症例に多く、心筋梗塞に移行する可能性が高い。血管が完全に狭窄している場合には、注入する細胞が障害部位に到達しない可能性があるため、事前に経皮的冠動脈形成術(PTCA)あるいは血栓溶解療法などにより狭窄部位を再開することが必要である。障害を受けた心筋細胞の部位に応じて、注入する細胞を心室型や心房型のように区別することができる。カテーテルの挿入法は右上腕動脈より挿入するSones法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)あるいは大腿動脈より挿入するJundkins法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)を利用することができる。

6. 心筋形成剤

本発明の心筋形成剤は、染色体DNAの脱メチル化剤、胎児の心臓発生領域で発現している因子、あるいは胎児の心臓発生段階で心筋細胞への分化に働く因子、心筋分化誘導因子の少なくとも一種類を有効成分として含有し、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させることができる。

当該心筋形成剤としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などをあげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、PDGF、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(midkine)、骨形成因子4(BMP4)などをあげることができる。PDGFとしては配列番号3または5のアミノ酸配列で表されるものが、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)としては配列番号64の

アミノ酸配列で表されるものが、エンドセリン1(ET1)としては配列番号66のアミノ酸配列で表されるものが、ミドカイン(Midkine)としては配列番号68のアミノ酸配列で表されるものが、骨形成因子4(BMP4)としては配列番号70のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。サイトカインは、例えば 10~40ng/ml の濃度で用いられる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。レチノイン酸は、例えば 10^{-9} M の濃度で用いられる。

接着分子としては、心臓発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン等があげられる。例えば、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホメオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx (配列番号 9:アミノ酸配列、配列番号 10:塩基配列)、GATA ファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4 (配列番号 11:アミノ酸配列、配列番号 12:塩基配列)、myocyte enhancer factor-2(MEF-2)ファミリーに属する転写因子 MEF-2A (配列番号 13:アミノ酸配列、配列番号 14:塩基配列)、MEF-2B (配列番号 15:アミノ酸配列、配列番号 16:塩基配列)、MEF-2C (配列番号 17:アミノ酸配列、配列番号 18:塩基配列)と MEF-2D (配列番号 19:アミノ酸配列、配列番号 20:塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND (配列番号 21:アミノ酸配列、配列番号 22:塩基配列)、eHAND (配列番号 23:アミノ酸配列、配列番号 24:塩基配列)と MesP1 (配列番号 61:アミノ酸配列、配列番号 62:塩基配列)、TEA-DNA 結合型転写因子ファミリーに属する TEF-1 (配列番号 25:アミノ酸配列、配列番号 26:塩基配列)、TEF-3 (配列番号 27:アミノ酸配列、配列番号 28:塩基配列)と TEF-5 (配列番号 29:アミノ酸配列、配列番号 30:塩基配列)などをあげることができる。

該心筋形成剤には心筋分化誘導因子の遺伝子を有効成分として含むものと、心筋分化誘導因子の本体である蛋白質を有効成分として含むものがある。

(1) 心筋分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分とする場合の調製法について述べる。

まず、心筋分化誘導因子の遺伝子 DNA 断片、あるいは全長 cDNA をウイルスベクタープラスミド内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクタープラスミドを造成する。

該組換えウイルスベクタープラスミドを、該ウイルスベクタープラスミドに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができる。例えばヒト腎臓由来の HEK293 細胞、マウス線維芽細胞 NIH3T3 などを用いることができる。

パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来の gag、pol、env などの蛋白質、レンチウイルスベクターの場合は HIV ウィルス由来の gag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef などの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来の E1A、E1B などの蛋白質、アデノ随伴ウイルスの場合は Rep(p5,p19,p40)、Vp(Cap)などの蛋白質を用いることができる。

ウイルスベクタープラスミドとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、心臓先天性遺伝子疾患の原因遺伝子に対する野生型の遺伝子を心筋細胞で転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

ウイルスベクタープラスミドとしては MFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)], pBabePuro [Nucleic Acids Research, 18, 3587-3596 (1990)], LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)], pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]等が用いられる。

プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。また、Nkx2.5/Csx 遺伝子のような心筋細胞特異的な遺伝子のプロモーターを用いることで、心筋細胞で特異的に目的の遺伝子を発現させることができる。

上記組換えウイルスベクタープラスミドを上記パッケージング細胞に導入することで組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクタープラスミドの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平 2-227075]、リポフエクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

上述した組換えウイルスベクターは、遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して心筋形成剤を製造することができる[Nature Genet., 8, 42 (1994)]。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればいかなるものでも用いることができる。例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。上記の心筋形成剤は、液体の場合はそのまま、固体の場合は治療の直前に必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して遺伝子治療に使用することができる。本発明の心筋形成剤の投与方法は、患者の治療部位の心筋に吸収されるように、カテーテル等を用いて局所的に投与方法等が用いられる。

上述した組換えウイルスベクターは試験管内で該心筋細胞への分化能を有する細胞に感染させた後、上述した心筋形成剤として調製し、患者に投与することができる。または、組換えウイルスベクターを患者の患部に直接投与することもできる。

(2) 蛋白質を有効成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子蛋白質を有効成分とする場合の調製法について述べる。

心筋分化誘導因子蛋白質の完全長 cDNA をもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、あるいは完全長 cDNA を発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の組換え発現ベクターを造成する。

該組換え発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。

宿主細胞としては、目的とする DNA を発現できるものは全て用いることができ、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属等に属する細菌、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、シワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子 DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、心筋分化誘導因子蛋白質の組換え発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、心筋分化誘導因子蛋白質をコードする DNA および転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pSE280 (Invitrogen 社製)、pGEMEX-1 (Promega 社製)、pQE-8 (QIAGEN 社製)、pKYP10 [特開昭 58-110600]、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製)、pGEX (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pET-3 (Novagen 社製)、pTerm2 (USP4686191、USP4939094、USP5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)] 等を例示することができる。

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6~18 塩基) に調節したものを用いることが好ましい。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (P_{trp})、lac プロモーター (P_{lac})、P_L プロモーター、P_R プロモーター、T7 プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1 プロモーター、

SPO2 プロモーター、penP プロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター (P trp x2)、tac プロモーター、letI プロモーター [Gene, 44, 29 (1986)]、lacT7 プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

本発明の心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子 DNA の蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

本発明の心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子 DNA の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュドモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394)、または Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15 等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プ

ロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シズサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNAI (Invitrogen 社製)、pCDM8 (Invitrogen 社製)、pAGE107 [特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pCDNAI/Amp (Invitrogen 社製)、pREP4 (Invitrogen 社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒト CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 [特開昭 63-299] 等をあげることができる。

組換えベクターの導入法としては、動物細胞に DNA を導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987), Virology, 52, 456 (1973)] 等を用いることができる。形質転換体の取得および培養

は、特開平 2-227075 号公報あるいは特開平 2-257891 号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル[Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)]、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント 1-38(1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII(ともに Invitrogen 社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21[Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H.Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平 2-227075]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

心筋分化誘導因子をコードする DNA を組み込んだ組換え体 DNA を保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に心筋分化誘導因子蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、心筋分化誘導因子蛋白質を製造することができる。

心筋分化誘導因子蛋白質を製造する形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機物等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの宿主が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中 pH は、3.0～9.0 に保持する。pH の調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル

— β —D—チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～8、30～40℃、5%CO₂ 存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上述の形質転換体の培養物から、心筋分化誘導因子蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、心筋分化誘導因子蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) —セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech 社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィ

ニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、細胞を回収後破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。

回収した該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、希釈あるいは透析により、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得る。

心筋分化誘導因子蛋白質またはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質またはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、培養物から遠心分離等の手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 5、6、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 および 30 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質等をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、米国 Advanced ChemTech 社製、Perkin-Elmer 社製、Amersham Pharmacia Biotech 社製、米国 Protein Technology Instrument 社製、米国 Synthecell-Vega 社製、米国 PerSeptive 社製、島津製作所社製等のペプチド合成機を利用して合成することもできる。

心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質は、上記(1)と同様にして心筋形成剤を形成し使用することができる。

7. 先天性遺伝子疾患の治療への利用

心不全をおこす疾患の中には、一部であるが単一遺伝子の変異により、本来心臓の分化または維持に必要な蛋白質の一部が欠損するために心不全となる一群がある。このような疾患としては、家族性肥大型心筋症、Fabry 病、QT 延長症候群、マルファン症候群、大動脈弁狭窄症、ミトコンドリア心筋症、Duchenne 型筋ジストロフィー症等があげられる。これらの疾患は、ミオシン、トロポニン、トロポミオシン、電位依存性 Na チャンネル、K チャンネル、

フィブリン、エラステイン、ミトコンドリア、ジストロフィンなどの遺伝子異常が原因であることが知られている[治療学, 30,1302-1306(1996)]。

上記疾患患者を治療する方法としては、疾患患者より本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を取得し、該細胞に正常な遺伝子を導入したのち、心臓に移植すること方法があげられる。正常な遺伝子は、上記6(1)で記載した遺伝子治療用のベクターに挿入したのちに、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に導入することができる。

8. 心筋細胞への分化能を有する細胞特異的な表面抗原を特異的に認識する抗体の取得

以下に、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体の調製法について述べる。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原を認識する抗体は、心筋梗塞などの心臓病の細胞治療を実施する上で必要な心筋細胞への分化能を有する細胞の純度検定や精製に用いることができる。

該抗体を取得する方法として、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞 $3 \sim 5 \times 10^5$ cells/匹、あるいは該細胞から調製した細胞膜画分 1~10mg/匹程を抗原として、ウサギ、ヤギまたは3~20週令のラット、マウスもしくはハムスター等の非ヒトほ乳動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント[例えば、フロイドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど]とともに投与する。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫測定法[酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒトほ乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹

水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾細胞が好適に用いられる。

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c 由来)骨髓腫細胞株である P3-X63Ag8-U1(P3-U1)株[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1)株[European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2)株[Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)株[J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)株[Nature, 256, 495 (1975)]等、マウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。

抗体産生細胞と骨髓腫細胞を混合し、HAT培地(正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた培地)に懸濁したのち、7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり酵素免疫測定法などにより、抗原に反応し、抗原を含まない蛋白質には反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿、または DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテイン A または G-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

上記方法で取得した、該心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体を用いて、検体細胞に対する反応性と造血系幹細胞、神経系幹細胞などの対照となる細胞に対する反応性とを比較することで、検体細胞が上記特異的表面抗原を発現しているかどうかを容易に検定することができる。

9. 心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原および該表面抗原をコードする遺伝子の取得

該心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原遺伝子の取得方法としては、二つの異なる由来のサンプル間で異なる発現形態を取る遺伝子を取得する

方法であるサブトラクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5738-5742 (1988)]や Representational difference analysis[Nucleic Acids Research, 22, 5640-5648 (1994)]による方法をあげることができる。

まず、心筋細胞への分化能を有する細胞より作製した cDNA ライブラリーを、造血系幹細胞や神経系幹細胞などの心筋細胞への分化能を有する細胞以外の対照細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う。心筋細胞への分化能を有する細胞特異的な遺伝子を濃縮した差分化 cDNA ライブラリーを調製した後、該差分化 cDNA ライブラリーの挿入 cDNA 配列を5' 末端側よりランダムに塩基配列解析を行い、分泌シグナル配列を持つものだけを選択する(ランダム配列解析)。このようにして得られた cDNA の全長塩基配列を決定することにより、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

上記の方法において、ランダム配列解析の代わりに、シグナルシーケンストラップ法も用いることもできる[Science, 261, 600-603 (1993); Nature Biotechnology, 17, 487-490 (1999)]。シグナルシーケンストラップ法とは、分泌シグナル配列をもつ遺伝子を選択的にスクリーニングする方法である。

効率よく特異的な表面抗原を取得するためには、シグナルシーケンストラップライブラリーをサブトラクションが行えるベクターを用いて作製し、心筋細胞への分化能を有する細胞から作製したシグナルシーケンストラップライブラリーを造血系幹細胞や神経系幹細胞などの対照となる細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う方法が望ましい。このようにして取得された分泌シグナル配列を含む DNA 断片は全長 cDNA をクローン化するためのプローブとして用いることができる。

全長 cDNA はその全長塩基配列を解析することで、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

ランダム配列解析あるいはシグナルシーケンストラップ法を用いた場合でも、得られたクローンが膜蛋白質をコードする場合は、塩基配列から類推されるアミノ酸配列に基づき合成ペプチドを作製し、該合成ペプチドを抗原として上記方法により特異的な抗体を取得することができる。

また、膜蛋白質の場合は、受容体をコードしているものがある。このような受容体は心筋

細胞への分化能を有する細胞の特異的な増殖、または心筋細胞への分化の調節に働いている可能性があり、当該受容体のリガンドの探索に用いることができる。分泌蛋白質の場合は、直接心筋細胞への分化能を有する細胞を増殖あるいは分化させるために用いることができる。

10. 心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子のスクリーニング

心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子のスクリーニング方法としては、心筋細胞への分化能を有する細胞を無血清培地中で培養させる際に、検体となる種々の物質を添加させ、該細胞が増殖するか、または心筋細胞へ分化誘導されるかで調べることにより行うことができる。

検体となる物質としては、各種サイトカインや増殖因子などの分泌蛋白質、細胞接着分子などの膜結合蛋白質、組織抽出液、合成ペプチド、合成化合物、微生物培養液等などいかなるものでもよい。

増殖能力はコロニー形成能や BrdU の取り込みなどで調べることができる。

コロニー形成能は、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を低密度で播種することにより調べることができる。

BrdU の取り込みは、BrdU を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色により調べることができる。

心筋細胞への分化を評価する方法としては、細胞の自律拍動を指標とする方法、細胞内に導入したレポーター遺伝子の発現を指標とする方法などがあげられる。

レポーター遺伝子の発現を指標とする方法は、心筋細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNA を心筋細胞への分化能を有する細胞に導入し、該細胞を用いてレポーター遺伝子の発現を調べる方法である。

レポーター遺伝子としては、GFP(Green fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼをコードする遺伝子などがあげられる。

心筋細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとしては、cardiac troponin I(cTNI) があげられる[J. Biological Chemistry, 273, 25371-25380 (1998)]。

11. 心筋細胞への分化能を有する細胞の不老化

心臓疾患の患者、特に高齢者に対して本発明の治療薬を投与する場合、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やすことが望ましい。

細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やす方法としては、テロメラーゼを本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法をあげることができる。

テロメラーゼを本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法としては、テロメラーゼの触媒サブユニットである TERT 遺伝子、具体的には配列番号 32 で表される DNA を、レトロウイルスベクターに導入し、該ベクターを心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する方法、心筋細胞への分化能を有する細胞に内在する TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を心筋細胞への分化能を有する細胞に投与する方法、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子をコードする DNA を含むベクターを心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する方法などをあげることができる。

上述の TERT 遺伝子を誘導発現させる因子は、TERT 遺伝子プロモーターと GFP (Green Fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、あるいはベクターガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子とを組み込んだベクター DNA を心筋細胞への分化能を有する細胞に導入することにより、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を選別することができる。

12. 心筋細胞への分化能を有する細胞を抗体を用いて分離する方法

生体内から取り出した各種組織から目的の表面抗原を発現している細胞を取得する方法としては、ソーティング機能を有したフローサイトメーターを用いる方法、磁気ビーズを用いる方法があげられる。

フローサイトメーターのソーティングの方式としては、水滴荷電方式、セルキャプチャー方式などがあげられる(フローサイトメーター自由自在、p14-23、秀潤社、1999年)。どちらの方法も、細胞の表面に発現している分子に結合した抗体から発せられる蛍光強度を電気信号に変換することにより抗原の発現量を定量することができる。また、使用する蛍光の種類を組み合わせることで、複数の表面抗原を利用して分離することも可能である。蛍光としては、FITC (fluorescein isothiocyanate)、PE (phycoerythrin)、APC (Allo-phycoerythrin)、TR (TexasRed)、Cy3、CyChrome、Red613、Red670、PerCP、TRI-Color、QuantumRed などがあげられる(フローサイトメーター自由自在、p3-13、秀潤社、1999年)。

染色方法としては、生体内から取り出した各種組織、具体的には骨髓または臍帯血から、遠心分離などの方法で細胞を分離したのち、直接抗体で染色する方法、一度適当な培地中で培養・増殖を行った後に抗体で染色する方法があげられる。

細胞の染色はまず、表面抗原を認識する一次抗体と目的の細胞サンプルを混合し、氷上で30分間～1時間、インキュベーションする。一次抗体が蛍光で標識されている場合には、洗浄後フローサイトメーターで分離を行う。一次抗体が蛍光標識されていない場合には、洗浄後一次抗体に対して結合活性を有する蛍光標識された二次抗体と一次抗体が反応した細胞とを混合し、再び氷上で30分間～1時間、インキュベーションする。洗浄後、一次抗体と二次抗体で染色された細胞をフローサイトメーターで分離を行う。

磁気ビーズを用いる方法では、目的の表面抗原を発現している細胞を大量に分離することができる。分離の純度は上述のフローサイトメーターを用いる方法には及ばないが、精製を繰り返すことにより、十分高い細胞純度を確保することができる。

細胞に一次抗体を反応させた後、細胞と反応しなかった一次抗体を除去し、一次抗体と特異的に結合する磁気ビーズを結合させた二次抗体を結合させる。残存する二次抗体を洗浄除去した細胞は磁石を設置したスタンドで分離することができる。これらの操作に必要な材料および装置は DYNAL 社から入手することができる。

磁気ビーズを用いる方法は、細胞サンプル中より不要な細胞を除去するのにも同様に利用することができる。不要な細胞をより効率的に除去するには Stem Cell Technologies Inc(Vancouver, Canada)より販売されている StemSep 法を用いることができる。

上述の方法で用いられる抗体としては、前記8で取得された抗体、または造血系細胞の表面抗原である CD34、CD117、CD14、CD45、CD90、Sca-1、Ly6c、Ly6g を認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原である Flk-1、CD31、CD105、CD144 を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原である CD140 を認識する抗体、インテグリンの表面抗原である CD49b、CD49d、CD29、CD41 を認識する抗体、マトリックス受容体である CD54、CD102、CD106、CD44 を認識する抗体があげられる。これらの抗体を組み合わせることで、より高い純度で目的の細胞を取得することができる。

具体的には、CD34 陰性、CD117 陽性、CD144 陰性細胞および CD140 陽性の性質を有する細胞を取得するには、ヒト骨髓細胞から CD34 陽性細胞と CD144 陽性細胞を上述した

免疫磁気ビーズの方法などを利用して除去した後、CD117 陽性および CD140 陽性の細胞画分を分取することで目的の細胞を分離することができる。

13. 心筋特異的な遺伝子のプロモーターレポーターベクターを用いた心筋前駆細胞の分離

心筋細胞への分化能を有する細胞から誘導した心筋細胞または心筋細胞の前駆細胞を効率的に分離するために、発光オワンクラゲの緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein; GFP) を遺伝子導入のためのレポーター遺伝子の指標として用いることができる。

具体的には、心筋細胞で特異的に発現している遺伝子または前記9項で取得した心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターの下流に GFP 遺伝子をつないだベクターを作製し、心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する。このようなレポーターベクターを導入された細胞を薬剤耐性などの指標で分離後、心筋細胞へと分化誘導する。分化誘導した細胞は GFP を発現し、蛍光を発生する。蛍光を発生した心筋細胞ならびに心筋前駆細胞はフローサイトメーターを用いて容易に分離することができる (フローサイトメーター自由自在、p44-52、秀潤社、1999年)。

心筋細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターとしては MLC2v やトロポニンI を用いることができる。

ベクターとしては、上述した動物細胞用のプラスミドベクター、アデノウイルスベクターなどをを用いることができる。

14. 心筋細胞への分化能を有する細胞から各種細胞への分化の誘導

(1) 心筋細胞への分化能を有する細胞から脂肪細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から脂肪細胞への分化を誘導する方法としては、核内受容体 PPAR- γ を活性化する因子を 0.4 μ M から 2 μ M の終濃度となるよう培地中に添加する方法が挙げられる。核内受容体 PPAR- γ の活性化因子としては、トログリダゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾン等のチアゾリジオン骨格を有する化合物をあげることができる。

または、培養皿一面に密集した細胞の培地中に、終濃度が 1 μ M dexamethasone、0.5 mM methyl-isobutylxanthine、0.01 mg/ml insulin、0.2 mM indomethacin となるように、それぞれを添加した培地で培養する方法も挙げられる。

(2) 心筋細胞への分化能を有する細胞から軟骨細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から軟骨細胞への分化を誘導する方法としては、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 個の細胞を遠心分離して得られた凝集塊に、終濃度が $0.01 \mu\text{g/ml}$ となるような TGF $\beta 3$ を含む培地で培養する方法が挙げられる。

(3) 心筋細胞への分化能を有する細胞から骨芽細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から骨芽細胞への分化を誘導する方法としては、細胞の培地中に終濃度 $0.1 \mu\text{M}$ dexamethasone、 0.05 mM ascorbic acid-2-phosphate、 10 mM β -glycerophosphate となるように、それぞれを添加した培地中で培養する方法が挙げられる。

15. Hoechst 33342 を用いた心筋細胞への分化能を有する細胞の分離

Hoechst 33342 は DNA 結合色素であり、生きたままの細胞を染色することができる。骨髄細胞の大多数は激しく分裂しているため、非常に明るく染色されるが、未熟な細胞ほど暗く染まる。これは、ABC (ATP binding cassette) トランスポーターによる色素排除能力が未熟な細胞ほど大きいことが知られている (中内啓光、蛋白質核酸酵素、Vol.45, No.13, 2056-2062, 2000)。従って、Hoechst 33342 を取り込まない細胞を分離することにより、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離することができる。

骨髄中から Hoechst 33342 で暗く染まる細胞を分離するには、骨髄細胞を Hoechst 33342 で染色した後、FACS を用いて UV レーザーをあてて短波長と長波長の 2 重染色を行うことにより解析を行うことができる。Hoechst 33342 を取り込まない未熟な細胞は Side population として分画することができる [Goodell, MA et al. J.Exp.Med., 183, 1797-1806 (1996)、http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new_site/index2.html]。

図面の簡単な説明

図1は、KUM 2細胞(A)および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD105 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図2は、KUM 2細胞(A)および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス Flk1 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は

陰性対象の結果である。

図3は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD31 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図4は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD144 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図5は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD34 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図6は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD117(c-kit)抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図7は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD14 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図8は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD45 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図9は、KUM 2細胞(A)およびBMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD90 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線

は陰性対象の結果である。

図10は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6A/E(Sca-1)抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図11は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6c 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図12は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6g 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図13は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD140 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図14は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD49b 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図15は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD49d 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図16は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD29 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、

実線は陰性対象の結果である。

図17は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD54 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図18は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD102 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図19は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD106 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図20は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD44 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

以下に実施例をあげて、本発明を具体的に示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1. マウス骨髄からの心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の取得と培養

5週齢の C3H/He マウス 10 匹をエーテルを用いて麻酔し、そのうえで頸椎脱臼により致死させた。マウスを半側臥位にして、70%エタノールを充分かけ消毒した。

次に大腿骨周辺の皮膚を広い範囲にわたり切開し、大腿骨全面の大腿四頭筋をはさみで切除した。膝関節の部分に軽くはさみを入れ、関節を外し、さらに大腿骨背面の筋肉を切除した。股関節の部分にはさみを入れ関節を外し、大腿骨を取り出した。大腿骨に付着している筋肉をはさみで切除し、大腿骨全体を露出させた。大腿骨の両端をはさみで切断後、テルモ製 23G の針を装着した 2.5ml 注射器に 20%FCS を含有する IMDM 培地を約

1.5ml 入れ、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込み、試験管の中に培養液を吹き出すことで、骨髓細胞を押し出した。取得した細胞は、20%FCS、100mg/ml penicillin、250ng/ml streptomycin、85mg/ml amphotericin を含有する IMDM 培地中で 33°C で、5% CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。継代を続けることで、細胞は間葉系の細胞へと均一化し、造血系の細胞は消失した。

約4ヶ月上記条件で培養を行い、不死化した細胞を選択した後、希釈により 192 種類の独立した単一細胞(single cell)由来の細胞株を樹立した(以下、骨髓由来初代不死化細胞株と称する)。これら独立のクローン由来の細胞にそれぞれに 3 μ M の終濃度になるように 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2 週間培養することで拍動する細胞を産生するクローンを選択した。骨髓由来初代不死化細胞 192 個のうち、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は3個であった。このうちの1つが KUM2 である。以後、骨髓細胞 KUM2 ならびに後述する多分化能幹細胞 BMSC は特別な指定がない限り、20%FCS、100mg/ml penicillin、250ng/ml streptomycin、85mg/ml amphotericin を含有する IMDM 培地中で 33°C で、5% CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。KUM2 細胞は 3 μ M の終濃度の 5-aza-C に 24 時間曝露することで、非特異的に自己拍動する心筋細胞が分化誘導してくるが、その頻度は非常に低かった(10⁷ cell に1つ以下)。

しかし、KUM2 細胞から出現する自己拍動する細胞周辺をクローニングシリンジで採取すると、増殖能の高い多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)と、限られた回数のみ増殖し心筋細胞へと分化する細胞(以下、単に心筋前駆細胞と称する)の少なくとも2種類の細胞が観察された。BMSC 細胞は、クローニングシリンジで回収した後、細胞を継代培養し、不死化する細胞を選別することで、クローン化を行った。BMSC 細胞は、その親株となる KUM2 よりも 100 倍以上効率的に分化誘導することが観察された。また心筋前駆細胞は再び 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2~3 週間培養することで多くの自律拍動する細胞が効率的に出現した。該心筋前駆細胞は、増殖条件下では、単核の線維芽細胞様の形態を呈し、心筋収縮蛋白質はほとんど発現していない。しかし 5-aza-C により最終分化を誘導すると形態は著しく変化した。

分化誘導1週間目頃より、一部の細胞は細胞質が大きくなり円形あるいは棒状を呈し、後に自律拍動を開始する細胞となるが、この時点では自律拍動を行うことは少なかった。分

化誘導後2週間になると、自己拍動を開始した。この自己拍動した細胞は互いに連結しあい、縦に連結して筋管細胞様となった。3週間以後には多くの細胞が縦に1列にならび、同期して収縮した。分化後4週間以後には培養皿の上の直接連結される細胞は、すべて同期して収縮し心筋組織様になった。マウスの心臓は、毎分300～400回程度の心拍数で収縮するが、これに対してマウス成体骨髄由来の細胞より分化した心筋細胞は、培養条件下において毎分120～250回の速さで規則的に収縮した。

実施例2. マウス骨髄細胞から誘導される心筋細胞の特性

骨髄由来細胞から形成される自律拍動する心筋様細胞が、実際に心筋細胞の性質を保有しているかどうかの解析を行った。

実施例1で取得した、骨髄由来初代不死化細胞株、マウス骨髄由来多分化能幹細胞 BMSC および心筋前駆細胞から分化誘導した心筋細胞から、それぞれ Trizol Reagents(GIBCO BRL 社製)を用いて全 RNA を取得した。次に、該全 RNA を基質として SuperscriptII reverse transcriptase(GIBCO BRL 社製)を用いて First strand cDNA を合成した。

次に、心筋細胞特異的な遺伝子の発現を検討するために、該 First strand cDNA を基質として、配列番号 33～58 に示した塩基配列を有する合成 DNA を用いて定量的 PCR を行った。心筋細胞特異的な遺伝子としては、ナトリウム利尿ペプチドである ANP および BNP、ミオシン重鎖である α -MHC および β -MHC、アクチンである α -skeletal actin および β -skeletal actin、ミオシン軽鎖である MLC-2a、MLC-2v、心筋細胞特異的転写因子である Nkx2.5/Csx、GATA4、TEF-1、MEF-2C、MEF-2D、MEF-2A を用いた。

ANP の増幅には配列番号 33、34 の塩基配列を有する合成 DNA を、BNP の増幅には配列番号 35、36 の塩基配列を有する合成 DNA を、 α -MHC の増幅には配列番号 37、38 の塩基配列を有する合成 DNA を、 β -MHC の増幅には配列番号 39、40 の塩基配列を有する合成 DNA を、 α -skeletal actin の増幅には配列番号 41、42 の塩基配列を有する合成 DNA を、 β -skeletal actin の増幅には配列番号 43、44 の塩基配列を有する合成 DNA を、MLC-2a の増幅には配列番号 45、46 の塩基配列を有する合成 DNA を、MLC-2v の増幅には配列番号 47、48 の塩基配列を有する合成 DNA を、Nkx2.5/Csx の増幅には配列番号 49、50 の塩基配列を有する合成 DNA を、GATA4 の増幅には配列番号 51、52 の塩基配

列を有する合成 DNA を、TEF-1 の増幅には配列番号 53、54 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2C の増幅には配列番号 55、56 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2D の増幅には配列番号 57、58 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2A の増幅には配列番号 59、60 の塩基配列を有する合成 DNA を用いた。

生体内で分化誘導する心筋細胞は、心筋収縮の心拍数またはエネルギー効率に違いを持たせるために、胎児期、新生児期あるいは成熟期によって、または心房筋あるいは心室筋の相違によって、心筋収縮蛋白質のアイソフォームに違いがある。

培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の場合、アイソフォームの発現様式は α -アクチンの場合は骨格筋型のほうが心筋型より多く発現し、ミオシン重鎖の場合は β 型のほうが α 型よりも多く発現していた。ミオシン軽鎖では 2v 型が発現しているのに対し、2a 型の発現は観察されなかった。

また、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の分化誘導後には、ナトリウム利尿ペプチドである ANP および BNP の発現が見られた。以上の心筋収縮蛋白質の発現様式より判断すると、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の表現型は胎児型心室筋細胞の形質を有すると考えられる。

培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞では、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2C、MEF-2D、TEF-1 遺伝子の発現が観察された。増殖中の骨髄由来初代不死化細胞株ではこれらの転写因子の発現は認められなかったが、増殖中の骨髄由来心筋前駆細胞では Nkx2.5/Csx、GATA4 および MEF-2C の発現が観察され、心筋細胞への分化誘導に伴い、遅れて MEF-2A および MEF-2D の発現誘導が観察された。

次に、ガラス微小電極により、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の活動電位を記録した。活動電位は、細胞を 1.49mM CaCl_2 、4.23mM KCl、25mM HEPES(pH7.4)を添加した IMDM 培地中で培養し、Diaphoto-300 実体顕微鏡(ニコン社製)下、温度 25°C で測定した。ガラス電極は電極抵抗を 15~30 Ω に設定して 3M KCl を充填した。膜電位の測定は MEZ-8300(日本光電社製)を用いて電流クランプモードで行った。測定結果は RTA-1100M(日本光電社製)を用いて熱感紙に記録した。その結果、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞は、洞結節細胞型と心室筋細胞型の2種類が観察された。両者に共通する活動電位の特徴は、①活動電位持続時間が長いこと、②比較的浅い静止期電位を持つこ

と、③ペースメーカー細胞にみられる静止期電位の緩やかな脱分極が認められることであった。また、心室筋細胞型では活動電位は Peak&Dome 型 (活動電位第1相を持つ) を呈した。洞結節細胞型の活動電位持続時間、拡張期膜電位、活動電位振幅は従来ウサギやラットで報告されている洞結節の活動電位と近似していた。心室筋細胞型ではこれに比べて、静止期膜電位は深く、活動電位振幅は大きい傾向を示した。分化誘導後、2～3 週間の細胞はすべて洞結節細胞型が記録されたが、分化誘導後4週間頃より心室筋細胞型が観察され時間経過とともに次第に増加した。

実施例3. サイトカインを用いた心筋細胞への分化の促進

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の心筋分化誘導率を増加させるため、5-aza-C で分化誘導をおこなう際に、各種サイトカインを添加して誘導率が増加するかどうか解析をおこなった。

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュあるいは 60mm フィブロネクチン付着ディッシュ (fibronectin-coated dish: Becton Dickinson 社製) に蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した上で、更に、PDGF のみ添加 (培養ディッシュA)、PDGF とレチノイン酸の両方添加 (培養ディッシュB)、添加なし (培養ディッシュC) の 3 種類の異なる処理を行い培養を継続した (終濃度は PDGF は 10ng/ml、レチノイン酸は 10^{-9} M)。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュAには PDGF を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュBには PDGF を終濃度 10ng/ml とレチノイン酸を終濃度 10^{-9} M になるように添加した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と PDGF あるいはレチノイン酸の添加を行った。

薬剤を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、PDGF を添加すると約4割、PDGF とレチノイン酸を同時に添加すると約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。また、フィブロネクチン付着ディッシュの3群では、培養ディッシュの3群に比べて、筋管様細胞になる細胞数が約 1 割程度ずつ増加した。

得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR を解析したところ、PDGFあるいはレチノイン酸は骨格筋に関係する MyoD、fTnI 遺伝子の発現を亢進するが、心筋に特異的に関係する cTnI、ANP の発現は誘導しなかった。

次に、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ となるよう添加した上で、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュD）、ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュE）、Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュF）、BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュG）、添加なし（培養ディッシュH）の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュDには FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュEには ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュFには Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュGには BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加して培養を継続した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と FGF-8、ET-1、Midkine あるいは BMP4 の添加を行った。

5-aza-C を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、FGF-8、ET-1、Midkine あるいは BMP4 を添加した培養ディッシュでは約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。

得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行ったところ、FGF-8、ET-1、Midkine あるいは BMP4 は、それぞれ単独で心筋に特異的な遺伝子である cTnI、ANP の発現を亢進することが観察された。

実施例4. DMSO を用いた骨髄由来幹細胞からの心筋細胞への分化誘導

実施例1に示した方法により、取得した心筋細胞への分化能のあるマウス骨髄由来多分

化能幹細胞(BMSC)に 3 μ M の 5-aza-C の代わりに 10 μ M の DMSO を添加し24時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えて、さらに6週間培養を続けた。

その結果、拍動する心筋細胞が分化誘導されることを見出し、これらの細胞には Nkx2.5/Csx および GATA4 遺伝子が発現しており、5-aza-C を添加したときと同様の性質を有した心筋細胞であることが示された。この解析結果は、5-aza-C と DMSO の共通の機能である染色体 DNA の脱メチル化が心筋細胞の分化に必要であることを示している。

実施例5. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞が多分化能を有する幹細胞および心筋前駆細胞であることの証明

マウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)から分化誘導する拍動細胞が心筋細胞の性質を保有していることは示されたが、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)に、心筋前駆細胞が存在しているのか、より未分化で心筋細胞以外の、例えば脂肪細胞などに分化可能な幹細胞が存在するかを調べるため、シングルセル・マーキング (Single cell marking)の実験を行った。

具体的には、分化誘導を行う前に、ある1つの細胞に GFP 遺伝子をウィルスベクターを導入して標識し、その後分化誘導させて標識した細胞がどのような細胞に分化したかで判断した。

まず、GFP 遺伝子を発現させるレトロウイルスベクタープラスミド GAR3-GFP および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクターを、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

この DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晚 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。

トランスフェクションは以下の通りに行った。

GAR3-GFP レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA 5 μ g を 250mM CaCl₂ (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄(pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。そ

の後、このDNA溶液を、前日に用意した293細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に37°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して2日後に、培養上清を0.45 μmのフィルター(Millipore社製)でろ過し、ウィルスベクターを含む溶液を回収した。この溶液をIMDM培地で10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵に希釈した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞は、ウィルスをインフェクションさせる前日に2×10⁴細胞/ウェルとなるように6ウェル・ディッシュに蒔いた。

希釈した、ウィルスベクターを含む溶液には、終濃度8 μg/mlとなるように、Hexadimethrine bromide(polybrene)(Sigma社製)を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)の培養上清2mlをウイルス液2mlと置換し、33°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。5時間後、培養上清を新しいIMDM培地に交換し、更に33°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2日間培養を行った後、蛍光顕微鏡下でGFPを発現している細胞を観察し、細胞1000個あたり1つのGFP陽性細胞があるような細胞群を得た。

該細胞を8×10³細胞/ディッシュとなるよう、35mmガラスベースディッシュ(旭テクノグラス社製)に蒔き、33°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、5-aza-C(Sigma社製)、PDGF-BB(Peprotech社製)、all trans レチノイン酸(Sigma社製)をそれぞれ終濃度3 μM、10ng/ml、10⁻⁹Mとなるよう添加し、添加して2日後および4日後には、培地交換を行うとともに、再度PDGF-BB(以降PDGFと略す)、all trans レチノイン酸を上述と同じ濃度で添加した。

4週間後、蛍光顕微鏡でGFP陽性細胞がどのように分化したかを観察すると、心筋細胞のみがGFP陽性になっている細胞集団、心筋細胞と未分化幹細胞がGFP陽性になっている細胞集団、ならびに心筋細胞、脂肪細胞および未分化幹細胞の3者がGFP陽性になっている細胞集団の3種類の細胞集団が見られた。すなわち、多分化能幹細胞から心筋前駆細胞が確率的(stochastic)に分化誘導してくることが明らかとなった。またこの結果は、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞には多分化能を有する幹細胞が存在する

ことを示した。

実施例6. 転写因子の強制発現による心筋細胞分化の促進

マウス心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)に心筋細胞分化に関係する転写因子を強制的に発現させることによる心筋細胞への分化に与える影響を解析した。

具体的には、分化誘導を行う前に、Nkx2.5/Csx または GATA4 遺伝子をウィルスベクターを用いて導入して、その後分化誘導させて心筋細胞への分化の効率を検討した。

まず、Nkx2.5/Csx を発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社)に Nkx2.5/Csx を組み込み、pCLNC-Nkx2.5/Csx を調製した。

また、GATA4 を発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社)の G418 耐性遺伝子部分をピューロマイシン耐性遺伝子に置換したプラスミド pCLPCX に、GATA4 を組み込み、pCLPC-GATA4 を調製した。レトロウイルスベクタープラスミド pCLNC-Nkx2.5/Csx と pCLPC-GATA4 および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクター (Imgenex 社)を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

これらの DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晚 37℃、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

トランスフェクションは以下の通りにおこなった。

pCLNC-Nkx2.5/Csx あるいは pCLPC-GATA4 レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA 5 μ g を 250mM CaCl₂ (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid), 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄ (pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37℃、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37℃、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、

ウィルスベクターを含む溶液を回収した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)は、ウィルスをインフェクションさせる前日に 2×10^4 細胞/ウェルとなるように6ウェル・ディッシュに蒔いておいた。

上記で取得したウィルスベクターを含む溶液に、終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ となるように、Hexadimethrine bromide(polybrene)(Sigma 社製)を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)の培地と置換し、 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。5時間後、新しい IMDM 培地に交換し、更に 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行い、さらに2日間培養を行った。

その後、pCLNC-Nkx2.5 と pCMV-Eco 導入で産生されたウィルスをインフェクションした細胞には、G418 を終濃度 $300 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、さらに7日間培養した。

一方、pCLPC-GATA4 と pCMV-Eco 導入で産生されたウィルスをインフェクションした細胞には、ピューロマイシンを終濃度 300ng/ml になるように添加し、さらに7日間培養した。

どちらの細胞も、この間に一部の細胞は死滅して浮遊した。生き残った細胞をトリプシンで浮遊させ、新しい培養皿に播種した。

このようにして、取得した Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の安定形質転換細胞について、上記実施例3の方法により分化誘導を行い、心筋細胞への分化の効率を検定した。

Nkx2.5/Csx を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5)と GATA4 を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ となるよう添加した。さらに24時間、 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った後に培地を新しいものに交換することで 5-aza-C を除去し、さらに4週間培養を続けた。位相差顕微鏡での筋管様細胞の数は Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の強制発現によっては大きく変化しなかった。次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である cTnI, ANP の発現を亢進することが観察された。

次にまず、Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を同時に心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞に発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLPC-GATA4 を、上述した方法に従い、組み換えウイルスを生産し、Nkx2.5/Csx を強制発現させた心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5)に感染させた後、300ng/ml の終濃度になるようにピューロマイシンを添加し、薬剤耐性クローン(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を取得した。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した。さらに 24 時間、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った後に培地を新しいものに交換することで 5-aza-C を除去し、さらに 4 週間培養を続けた。位相差顕微鏡での筋管様細胞の数は Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子の強制発現によっては大きく変化しなかったが、拍動する心筋細胞の数は両遺伝子を強制発現していない心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞と比較して 50 倍以上増加した。次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号 71～78 で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、Nkx2.5/Csx と GATA4 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である cTnI, ANP の発現を亢進することも観察された。

実施例 7. 転写因子の強制発現とサイトカインの組み合わせによる心筋細胞分化の促進

上述した心筋分化促進能のある転写因子(Nkx2.5/Csx, GATA4)とサイトカイン(FGF-8, ET-1, Midkine, BMP4)を組み合わせることによる、心筋細胞分化に及ぼす影響を解析した。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した上で、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養デ

ィッシュI)、ET-1を終濃度 10ng/mlになるように添加 (培養ディッシュJ)、Midkineを終濃度 10ng/ml になるように添加 (培養ディッシュK)、BMP4を終濃度 10ng/ml になるように添加 (培養ディッシュL)、添加なし(培養ディッシュM)の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュIには FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュJには ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュKには Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュLには BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加して培養を継続した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 の添加を行った。

5-aza-C を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 を添加した培養ディッシュでは約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。一方、拍動する心筋の数は FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 の添加により増加しなかった。

次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 は Nkx2.5/Csx と GATA4 の強制発現により促進される cTnI, ANP の発現をさらに亢進することはなかった。

実施例8. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞の心臓への移植

心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞が生体内で心筋に分化し心臓に定着するかどうかを明らかにするために、実施例5で作製した、GFP で標識した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-GFP)を、マウスへ移植するためのドナー細胞とした。具体的には、以下の方法を実施した。GFPで標識したBMSC細胞を予め5-aza-Cで24時間処理した後、 1×10^8 cells/ml となるよう PBS に懸濁し、移植直前まで氷上で保存した。なお、BMSC 細胞は 0.05%エリスロシン染色により 95%程度生存していることを確認している。

一方、レシピエントの C3H/He マウス(日本チャールズリバー社製)は、エーテルを用いて麻酔の導入を行い、テルモ製のテルモシリンジ(1ml)を用いてチオペンタール 30mg の腹腔

内投与することで麻酔の維持を行った。マウスの四肢をテープでコルク板に固定し、さらに首が反り返るように上顎をゴムでコルク板に固定した。この時点で左右の上肢及び右下肢に心電図電極を刺入し心電図のモニタリングを行った。続いて、メーヨ剪刀(NONAKA RIKAKI CO.,LTD NK-174-14)で頸部を気管にそって1 cm ほど切開し、白十字社のベビー綿棒で甲状腺を左右に剥離をし、気管周囲の筋肉をマイクロ剪刀(NONAKA RIKAKI CO.,LTD NY-334-08)で切開し気管を露出した。ついでマイクロフェザー(メス)で気管を1mm ほど切開しここからJ型に変型させたテルモ製サーフローフラッシュ(22G)の針を挿入し口腔から外に出し、この針をガイドにサーフローフラッシュ(20G)の外筒を気管内に挿入した。この外筒にレスピレータ(シナノ製作所製の MODEL SN-480-7)をつなぎ 100 パーセント酸素を1ml/分で流し、一回換気量は1ml、呼吸回数は120/分で人工呼吸を開始した。このときにガイド針を挿入した穴からエアーがもれるので気管周囲の皮膚をモスキート鉗子(NONAKA RIKAKI CO.,LTD)を用いて気管をおおうようにして閉鎖した。つぎに、胸骨柄より頸部に向かい、2cm ほどメーヨ剪刀で切開、ついで胸骨を2cm ほど胸骨柄から頸部に向かい切開をした。出血をバイポーラの電気メスで止血し、テルモ製のテルモシリンジ(1ml)にジールサイエンス社製の30Gの針(メタルハブ交換針 N730)をつけて心尖部にドナー細胞をPBSに浮遊した液体を0.1ml 注入した。ついで ETHICON 社製の4-0 ETHIBOND X761を用いて胸骨の閉鎖、皮膚の閉鎖を行い、同じ針糸で頸部の皮膚の閉鎖をした。自発呼吸の出現を確認しレスピレータをはずしインファントウオーマーを37℃に加熱しこの中で覚醒を待った。なお本実験の操作は DESIGN FOR VISION 4.5× SURGICAL TELESCOPESを用いて行った

移植して77日後のマウスから組織を摘出し、10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。包埋した組織サンプルをマイクロームで6 μ mの厚さに薄切し、予め poly-L-lysine でコーティングしておいたスライドガラス上に貼り付けた。100%キシレンに浸して脱パラフィンをした後、エタノールで洗浄し、更に0.3% H_2O_2 溶液に30分間浸して抗体反応の前処理をおこなった。

その後、PBSで洗浄したサンプルに対し、5%正常ブタ血清溶液を30分間反応させ、ブロッキングをおこなった。ブロッキング後、PBSで洗浄し、PBSで100倍に希釈したマウス抗GFPモノクローナル抗体(CLONTECH社製)で4℃に一晩置き、抗体反応をおこなった。P

BSで洗浄後、パーオキシダーゼ標識デキストラン結合ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体(DACO 社製)を室温で 30 分間反応させた。更に PBS で洗浄後、発色液[10 μ g/ml 3, 3'-Diaminobenzidine(DAB) Tetrahydrochloride)、0.01% H_2O_2 、0.05M Tris-HCl(pH6.7)]を添加して10分間程度反応をおこない、PBSで洗浄して反応を停止させた。更に、そのスライドガラスに対して、メチルグリーン染色もおこなった。

一方、組織切片の形態を明らかにするため、連続切片の一部をヘマトキシリン・エオジンで染色した。

その結果、心筋細胞および血管内皮細胞において、GFP 抗体陽性細胞が見られた。従って、マウス骨髄細胞は、移植により心筋細胞および血管内皮細胞に分化したといえる。

実施例9. 培養心筋細胞由来の因子による骨髄細胞の心筋分化促進

実施例8で示したように、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)を心臓に移植することで心筋への分化が観察された。この結果は、心筋細胞自身が骨髄細胞を心筋細胞へ分化誘導する因子を発現している可能性を示唆している。この仮説を検証する目的で妊娠 16 日目の C3H/He マウスから胎児心臓を摘出し、公知の方法(心臓血管研究方法の開発。江橋節朗編集、学会出版センター発行、1983)に従って、心筋細胞の初代培養細胞を樹立した(以後、培養心筋細胞と称する)。

まず、培養心筋細胞から分泌される因子に心臓分化を促進させる活性があるかどうかを検証するために、培養心筋細胞を 6cm の培養ディッシュに 5×10^6 cells を 72 時間培養した後、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製)でろ過し、ろ過した培養上清と等量の培地を加えて、培養心筋細胞から分泌される因子を含む培養液(以後コンディションド・ミイデウムと称する)を調整した。

あらかじめ心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)あるいは Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 6cm の培養ディッシュに 1×10^5 細胞となるよう培養し、その後コンディションド・ミイデウムと培地を置換した。このとき同時に 5-aza-C を終濃度 3 μ M になるように添加した。翌日、培地を新しいコンディションド・ミイデウムに交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に一度培地を新しいコンディションド・ミイデウムと交換した。その結果、コンディションド・ミイデウムの添加により、心筋細胞への分化能を有する骨髄幹細胞(BMSC)

からの筋管様細胞の増加は観察されなかったが、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現が亢進することが観察された。一方、Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)はコンデিশヨンド・ミイディアムの添加により、筋管細胞の数は増加せず、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現は Nkx2.5 と GATA4 以上による発現亢進と同じレベルであり、促進効果は観察されなかった。

次に、心筋細胞が発現している細胞外基質(ECM)に心筋分化促進活性があるかどうかを検証するために、心筋細胞を培養した培養ディッシュから 0.45%のトリプシン・EDTA を 30 分間程度処理することで心筋細胞を除去し、培養心筋細胞の細胞外基質をコートした培養ディッシュ(以後 ECM コート・ディッシュと称する)を作製した。次に、この 6cm の ECM コート・ディッシュ上に心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)あるいは Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 1×10^5 細胞となるよう培養し、その後 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ になるように添加した。翌日、5-aza-C を除去するために新しい培地に交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に 1 回程度、培地を新しいものに交換した。心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)は ECM コート・ディッシュにより筋管様細胞の数は増加しなかったが、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現が亢進することが観察された。一方、Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)は ECM コート・ディッシュにより、筋管細胞の数は増加せず、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現は Nkx2.5 と GATA4 以上による発現亢進と同じレベルであり、促進効果は観察されなかった。

次に、 2×10^4 個の培養心筋細胞と、 8×10^4 個の心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)または 8×10^4 個の Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)とを 6cm の培養ディッシュで共培養を行った。培養心筋細胞と骨髄細胞を識別するために、2 種類の骨髄細胞(BMSC と BMSC-Nkx2.5-GATA4)は実施例 5 で示した方法により GFP で標識したものを利用した。共培養を開始した翌日に 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ になるように添加し、その翌日に 5-aza-C を除去するために新しい培地に交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に 1 回程度、培

地を新しいものに交換した。その結果、BMSCまたはBMSC-Nkx2.5-GATA4を単独で培養したときと比較して、約 10 倍拍動する心筋の数が増加した。この結果、Nkx2.5 と GATA4 遺伝子の強制発現と心筋細胞との共培養を組み合わせることで、心筋分化効率は500倍以上上昇することが明らかになった。

実施例10. KUM2 細胞と BMSC 細胞の表面抗原の解析

KUM2 細胞と BMSC 細胞の異同を明らかにすること、骨髓中から効率的に心筋形成能を有する単離・精製するために、KUM2 細胞と BMSC 細胞の表面抗原の解析を行った。

解析に用いたのは、血管内皮細胞の表面抗原として知られている CD105、Flk-1、CD31、CD144、造血系細胞の表面抗原として知られている CD34、CD117(c-kit)、CD14、CD45、CD90、Ly6A/E(Sca-1)、Ly6c、Ly6g、間葉系細胞の表面抗原として知られている CD140、インテグリン CD49b、CD49d、CD29 マトリックス受容体 CD54、CD102、CD106、CD44 の 20 種類である。

まず KUM2 細胞および BMSC 細胞の各 1×10^4 個を96ウェルU字プレートにそれぞれ分注した。公知の方法[酵素抗体法：学際企画刊(1985)]でビオチン標識した抗マウス CD105 抗体(Pharminen 社製)をFACS用緩衝液(1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%Na₃N₃、pH7.4)に加え各ウェルに添加し、氷中で 30 分間反応させた。コントロール抗体としては、ラット IgG2a、 κ 精製抗体(Pharminen 社製)を用いた。緩衝液で2回洗浄後、ストレプトアビジン-PE(日本ベクトン・ディッキンソン社製)を 20 μ l 加えた。遮光し氷中で30分間反応後、緩衝液で3回洗浄し、最終的に 500 μ l に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、抗体の添加により蛍光強度が増加するか否かで抗体の発現の有無を調べた。その結果を第1図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに CD105 陰性であった。

Flk-1 抗原の発現についても、上記と同様の方法によりビオチン化した抗マウス Flk-1 抗体(Pharminen 社製;PM-28181D)を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果を第2図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに Flk-1 陰性細胞であった。

CD31 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD31 抗体(Pharminen 社製;PM-01954D)を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果を第3図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに CD31 陰性であった。

CD144 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD144 抗体 (Pharmingen 社製; PM-28091D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第4図に示す。KUM2 細胞は CD144 陰性細胞であったが、BMSC 細胞は CD144 弱陽性細胞であった。

CD34 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD34 抗体 (Pharmingen 社製; PM-09434D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第5図に示す。KUM2 細胞は CD34 陰性細胞であったが、BMSC 細胞は CD34 陽性細胞と陰性細胞の混合物であった。

CD117 (c-kit) 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD117 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01904D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第6図に示す。KUM2 細胞は CD117 陰性細胞であったが、BMSC 細胞は CD117 陽性細胞であった。

CD14 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD 14抗体 (Pharmingen 社製; PM-09474) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第7図に示す。KUM2 細胞は CD14 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD14 陰性細胞であった。

CD45 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD45 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01114) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第8図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD45 陰性細胞であった。

CD90 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD90 抗体 (Pharmingen 社製; PM-22214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第9図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD90 陰性細胞であった。

Ly6A/E(Sca-1)抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6A/E(Sca-1)抗体 (Pharmingen 社製; PM-01164A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第10図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6A/E(Sca-1)陽性細胞であった。

Ly6c 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6c 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01152) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第11

図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6c 陽性細胞であった。

Ly6g 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6g 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第12図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6g 陰性細胞であった。

CD140 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD140 抗体 (Pharmingen 社製; PM-28011A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第13図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD140 陽性細胞であった。

CD49b 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49b 抗体 (Pharmingen 社製; PM-09794) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第14図に示す。KUM2 細胞は CD49b 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD49b 陰性細胞であった。

CD49d 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49d 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01274) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第15図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD49d 陰性細胞であった。

CD29 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD29 抗体 (Pharmingen 社製; PM-22634) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第16図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD29 陽性細胞であった。

CD54 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD54 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01544) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第17図に示す。KUM2 細胞は CD54 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD54 陰性であった。

CD102 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD102 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01804) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第18図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD102 陰性細胞であった。

CD106 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD106 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01814) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第19図に示す。KUM2 細胞は CD106 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD106 陰性細胞であった。

CD44 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD44 抗体 (Pharmingen 社製;

PM-28154)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第20図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD44 陽性細胞であった。

表1にフローサイトメーターで測定した解析結果をまとめた。

表1

	KUM2	BMSC
Hemato		
CD34	-	± *1
CD117(c-kit)	-	+
CD14	+	-
CD45	-	-
CD90(Thy1)	-	-
Ly-6a/e(Sca1)	+	+
Ly6c	+	+
Ly6g	-	-
Endothelial		
Flk-1	-	-
CD31	-	-
CD105	-	-
CD144	-	+ *2
Mesenchymal		
CD140 (PDGFR)	+	+
Integrin		
CD49b(α2)	+	-
CD49d(α4)	-	-
CD29(β1)	+	+
Matrix		
CD54(ICAM-1)	+	-
CD102(ICAM-2)	-	-
CD106(VCAM-1)	+	-
CD44(Hyaluronate)	+	+

*1:混合物 *2:弱陽性

実施例11. マウス MLC2v プロモーターを利用した分化前駆細胞の濃縮

心筋細胞への分化を有するマウス骨髄由来細胞から心筋に分化する細胞を効率よく取得するため、心筋細胞に特異的に発現するマウス MLC2v(myosin light chain-2v) 遺伝子のプロモーター発現系を構築した。具体的には、マウス MLC2v 遺伝子のプロモーター配列下に EGFP 遺伝子 (CLONTECH 社製)をつなぎ、neomycin 耐性遺伝子の発現ユニット含んだ pMLC-2-EGFP プラスミドを構築した。このプラスミドの DNA を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等に記

載のアルカリ中和法により取得した。

上記 DNA 2 μ g を、予め6穴プレートに 1×10^5 個となるように培養しておいた KUM2 細胞に対し、リポフェクトアミン (LIFE TECHNOLOGY 社製) を用いて遺伝子導入をおこなった。具体的な方法は製品の添付プロトコルに従った。遺伝子導入して 48 時間後に G418 (Sigma 社製) を終濃度 1mg/ml となるよう添加し、生存している遺伝子導入細胞だけを選択した。

遺伝子を導入して 14 日目の細胞に対し、5-aza-C を終濃度 3 μ M となるように添加し、24 時間後に培地を交換して、分化誘導をおこなった。分化誘導後、3 日目より GFP 陽性細胞が観察された。分化誘導後 4 日目の細胞うち、 1×10^4 個の細胞を FACS Caliber (Becton Dickinson 社製) で GFP 陽性細胞のみを分取し更に培養を続けた。その結果、9 割以上の細胞が筋管様構造を有する細胞に分化しており、効率的に分化する細胞を濃縮できたといえる。この GFP 陽性細胞は FACS で分取後、実施例 10 の方法に従い、移植を行うと血管内皮への分化は認められず、骨格筋や心筋などの筋肉系組織への分化が特異的に観察された。

実施例12. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞からの脂肪細胞の誘導

心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞 (BMSC) は心筋細胞以外に脂肪細胞に分化誘導することができる。この脂肪細胞への分化を制御する目的で分化誘導条件の検討を行った。まず、PPAR- γ 受容体の発現を定量的 PCR 法により解析を行った結果、BMSC 細胞は PPAR- γ 1 受容体は発現しているが、PPAR γ 2 受容体は発現していないことが観察された。次に、PPAR- γ 受容体のアゴニストである Pioglitazone、Troglitazone を、様々な濃度で心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞 (BMSC) に添加したところ、濃度依存的に脂肪細胞分化が促進され、0.4 μ M で約 50%、2 μ M ではほぼ 100%の細胞が脂肪細胞へと分化した。

実施例13. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞を胚盤胞への移植による神経系細胞、肝細胞、心筋細胞への分化誘導

はじめに、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞 (BMSC) を GFP で標識した安定形質転換細胞を得るため、以下の方法で遺伝子導入をおこなった。

まず、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社) に GFP を組み込み、

pCLNC-GFP を調製した。レトロウイルスベクタープラスミド pCLNC-GFP と Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクター (Imgenex 社) を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

これらの DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晚 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

トランスフェクションは以下の通りにおこなった。

pCLNC-GFP レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA 5 μ g を 250mM CaCl₂ (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄(pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、ウィルスベクターを含む溶液を回収した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞(BMSC) は、ウィルスをインフェクションさせる前日に 2×10⁴ 細胞/ウェルとなるように 6ウェル・ディッシュに蒔いておいた。

上記で取得したウィルスベクターを含む溶液に、終濃度 8 μ g/ml となるように、Hexadimethrine bromide (polybrene) (Sigma 社製) を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞(BMSC) の培地と置換し、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。5時間後、新しい IMDM 培地に交換し、更に 33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2 日間培養を行った後、G418 を終濃度 300 μ g/ml になるように添加し、さらに 7 日間培養した。この間に一部の細胞は死滅して浮遊した。生き残った細胞をトリプシンで浮遊させ、新しい培養皿に播種した。

このようにして取得した、GFP 標識された心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を、6cm の培養ディッシュで増殖させ、培地を除去後、0.5ml の 0.25% のトリプシン EDTA を添加して 1 分間処理した後、1.5ml の新しい培地を添加して、細胞を懸濁したところに、ウシ胎児血清 (Lexicon Genetics 社製) を加えて混合し、該細胞懸濁液をマウス胚盤胞への注入に用いた。マウス胚盤胞は過排卵処理を施した雌の C57Bl/6J マウスを同系の雄マウスと自然交配させ、4 日後に摘出した子宮の内部を M15 培地で灌流することにより取得した。これらを 37°C、5% CO₂ 条件下で胚盤胞腔が十分に膨らむまで放置した後、約 4°C に冷却した 20mM の HEPES を含む M15 培地中に移し、マイクロインジェクター (成茂科学社製) 及びマイクロマニピュレーター (成茂科学社製) を装備した倒立顕微鏡 (ニコン社製) 下で観察しながら、注入針を操作し 10~15 個の BMSC 細胞を胚盤胞腔内へ顕微注入した。該胚盤胞を 37°C、5% CO₂ 条件下で胚盤胞腔が膨らむまで放置した後、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) に記載の方法に従い、偽妊娠の雌 MCH 系統のマウスの卵管側子宮部分に移植後、着床させた。

偽妊娠の雌 MCH 系統のマウスは、10 週以降の精管結さつ雄 MCH 系統マウスと移植 3 日前の 17:00 に 1:1 で同居、交配させ、翌朝 9:00 に膣栓確認を行い、2 日後に上記の目的で使用了。

誕生したマウスを解剖して、臓器を摘出し、GFP の発現を観察した。その結果、脳内ならびに肝臓で GFP の発現が観察され BMSC が神経系ならびに肝臓に分化することが示された。また、別の個体から取得した心臓より、ゲノム DNA を取得し、配列番号 79、80 のプライマーを用いて PCR を行った結果、BMSC が心臓にも取り込まれことが確認された。これらの結果は、BMSC が、神経、心臓、肝臓の 3 胚葉すべてに分化できる全能性を有していることを示した。

実施例 14. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞でのテロメラーゼ活性

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞のテロメラーゼ活性は Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 法により検討した (Oncor 社製 TRAPeze Telomerase Detection Kit)。テロメラーゼ活性の測定は原則的に添付されていたプロトコールに従ったが、具体的には以下の通りに行った。まず、6cm 径の培養皿上で培養した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞 (およそ 10⁶ 個) を PBS で洗浄した後、200 μ l の 1×CHAPS

液を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、溶液と共に細胞を 1.5ml 容遠沈管に回収し、14,000rpm で 20 分間遠心分離(4℃、HITACHI 社製 himacCF15)し、上清を細胞抽出液として回収した。Protein assay (BioRad 社製)を用いて蛋白質含有量を測定したところ、上記条件で取得した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の細胞抽出液はおよそ 1mg/ml であった。

次にこの細胞抽出液を用いて、プロトコールに従ってテロメア伸長反応及び PCR 増幅を行った。Taq ポリメラーゼは EX Taq polymerase (宝酒造製)を用いた。反応終了後の試料は 10×染色液(0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glycerol)を 1/10 量添加し、12.5% ポリアクリルアミドゲル (TRApeze Telomerase Detection Kit のプロトコールに記載されている通り調製)に載せ、250mV 定電圧下で泳動した。泳動後、ゲルをサイバークリーン (FMC 社製)で染色し、蛍光色素分析装置、Fluorolmager (Molecular Dynamics 社製)を用いて解析した。その結果、細胞抽出液の終濃度が 0.4~4 μ g/ml の試料でテロメラーゼ活性が検出された。

実施例15. ラット骨髄からの心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の取得と培養

5週齢の Wistar rat (日本 SLC 株式会社)雌6匹を頸椎脱臼した後、70%エタノールを充分かけ消毒した。次に足部の皮膚を広範囲に渡り切開し、大腿骨や脛骨を覆う筋肉を切除しながら、大腿骨と脛骨を取り出した。取り出した大腿骨と脛骨は PBS (GibcoBRL 社製)の入った 10cm 径培養皿 (岩城硝子社製)に移し、筋肉及び関節を完全に切除した。続いてこれらの骨の両端をハサミで切り、20G 注射針を付けた 10ml 用注射器 (テルモ社製)を用いて、培養液 (D-PBS、GibcoBRL 社製)の水流で骨髄中の内容物を押し出した。取得した細胞塊はさらに注射器を通して一様になるようにほぐした。このようにして得た細胞浮遊液は 50ml 容遠沈管 (BECTON DICKINSON 社製)に回収し、1,500rpm で 10 分間遠心分離し (TOMY 社製低速遠心機)、沈殿した細胞を 6ml の D-PBS 中に懸濁した。改良ノイバウエル型血球計算盤にて細胞数を計測したところ、回収した細胞は合計 2.6×10^9 個であった。大腿骨または脛骨 1 本当たりから 1×10^8 個の細胞を回収したことになる。回収した細胞は 1ml 当たり 1.3×10^8 個の濃度になるよう希釈し、50ml 容遠沈管に入った 1.073g/ml に調製された Percoll (Amersham Pharmacia Biotech 社製)/D-PBS 液 (25ml) 上に 5ml 重層した後、室温で 3,100rpm で 30 分間遠心分離した。遠心分離後、Percoll 液と細胞浮遊液との界面

より細胞を回収し、D-PBS で 4 倍に希釈した後、2300rpm で 10 分間遠心分離し、分画した細胞集団を回収した。回収した細胞は 20%FCS、100 μ g/ml penicillin, 250 ng/ml streptomycin, 85 μ g/ml amphotericin (GibcoBRL 社製)を含む IMDM 培地 (GibcoBRL 社製)に懸濁した。この時点で再度細胞数を計測したところ、回収した骨髄由来細胞は合計 4.7×10^7 個あり、処理前の細胞の約 2%相当を回収したことになる。このようにして分画した骨髄由来細胞は $2 \sim 5 \times 10^5$ 個/cm² になるように 10cm 径の動物細胞用の培養皿 (岩城硝子社製、以下 10cm 培養皿と略す) 3枚に撒き、CO₂ 培養器 (タバイ社製) にて 33°C、5%CO₂ 濃度で培養を開始した。培地は 24 時間後、72 時間後にそれぞれ半分交換した。その 3～4 日後に培地を半分交換した。15 日経過し、コロニーが密集してきたので、細胞をトリプシン EDTA 処理ではがし、2/3 は 4ml の保存液 (10%DMSO、50%の骨髄由来細胞培養上清、40%の未使用上記培地) に懸濁し、2ml 容チューブ (住友ベークライト社製) に 1 本当たり 1ml 分注して凍結保存し、残り 1/3 は 10cm 培養皿 2 枚に蒔き直し継代した。

実施例16. ラット骨髄由来細胞の心筋細胞への分化能の検討

上記で継代したラット骨髄由来細胞は密集したところを再度トリプシン EDTA 処理ではがし、6 ウェルプレート (BECTON DICKINSON 社製) には 1 ウェル当たり 5×10^4 個になるように、またヒトフィブロネクチンをコートした 6cm 径の培養皿 (BECTON DICKINSON 社製 Biocoat) には 1.3×10^5 個になるように細胞を蒔き直した。1 日後に 5-アザシチジン (Sigma 社製、終濃度 10 μ M) のみを加えたものと、5-アザシチジン、PDGF-BB (Pepro Tech EC LTD. 社製、終濃度 10ng/ml)、all-trans レチノイン酸 (RA、Sigma 社製、終濃度 10^{-9} M) を加えた二種類の異なる培養条件培養を行い、2 日間培養した後に培地を交換した (後者の場合は培地交換時に再度 PDGF、all-trans レチノイン酸を加え、2 日後と 4 日後にさらに加えた)。その 3～4 日後に、培地を交換し、3 週間培養した。その結果 5-アザシチジン、PDGF-BB、レチノイン酸を加えたもので筋管様細胞の分化が観察された。

実施例17. 転写因子 MesP1 の強制発現およびサイトカイン添加による心筋細胞分化の促進

心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞 (BMSC) に、心筋細胞分化に関係する転写因子 MesP1 を強制的に発現させることによる心筋細胞への分化に与える影響、および MesP1 の強制発現とサイトカイン (FGF-8, ET-1, Midkine, BMP4) の添加とを組み合わせることによる

心筋細胞への分化に与える影響を解析した。

実施例6で示した方法と同様の方法で、レトロウィルスベクターを用いて、MesP1 遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-MesP1)を取得し、その後分化誘導させて心筋細胞への分化の効率を検討した。

MesP1 を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-MesP1) を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ となるように添加した後、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュN）、ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュP）、Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュQ）、BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュR）、添加なし（培養ディッシュS）の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュNには FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュPには ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュQには Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュRには BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加して培養を継続した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 の添加を行った。

5-aza-C を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、MesP1 の強制発現によって筋管様細胞の数は大きく変化しなかった。また、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 を添加した培養ディッシュでは約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。

次に、得られた筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、MesP1 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である ANP の発現が亢進された。一方、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 は MesP1 の強制発現により促進される ANP の発現をさらに亢進することはなかった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、心筋細胞の破壊ならびに変性を伴う心疾患の治療ならびに治療薬の探索に有効な骨髄細胞、増殖因子、ビタミン、接着分子、及びこれらの利用法が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号33－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号34－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号35－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号36－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号37－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号38－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号39－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号40－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号41－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号42－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号43－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号44－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号45－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号46－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号47－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号48－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号49－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号50－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号51－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号52－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号53－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号54－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号55－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号56－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号57－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号58－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号59－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号60－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号61－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号62－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号63－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号64－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号65－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号66－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号67－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号68－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号69－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号70－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号71－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号72－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号73－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号74－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号75－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号76－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号77－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号78－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号79－人工配列の説明:合成 DNA
配列番号80－人工配列の説明:合成 DNA

請求の範囲

1. 生体組織または臍帯血から単離され、少なくとも心筋細胞に分化する能力を有する細胞。
2. 生体組織が骨髄である、請求項1記載の細胞。
3. 細胞が、多分化能幹細胞であることを特徴とする、請求項1または2記載の細胞。
4. 細胞が、少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞。
5. 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、請求項1～4のいずれか1項に記載の細胞。
6. 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞。
7. 細胞が、成体組織のいかなる細胞にも分化する能力を有する全能性幹細胞であることを特徴とする、請求項1～3記載の細胞。
8. 細胞がCD 117陽性およびCD 140陽性である、請求項1～7のいずれか1項に記載の細胞。
9. 細胞が、さらに CD 34陽性である、請求項8記載の細胞。
10. 細胞が、さらに CD 144陽性である、請求項9記載の細胞。
11. 細胞が、さらに CD 144陰性である、請求項9記載の細胞。
12. 細胞が、CD 34陰性である、請求項8記載の細胞。
13. 細胞が、さらに CD 144陽性である、請求項12記載の細胞。
14. 細胞が、さらに CD 144陰性である、請求項12記載の細胞。
15. 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、請求項10記載の細胞。
16. 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD

106陰性および CD 44陽性である、請求項11記載の細胞。

17. 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、請求項12記載の細胞。

18. 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、請求項13記載の細胞。

19. Hoechst 33342を取り込まない、請求項1記載の細胞。

20. 請求項1～19のいずれか1項に記載の細胞から誘導される心筋細胞のみに分化誘導される心筋前駆細胞。

21. 心室筋細胞に分化する能力を有する、請求項1～20のいずれか1項に記載の細胞。

22. 洞結節細胞に分化する能力を有する、請求項1～20のいずれか1項に記載の細胞。

23. 生体組織または臍帯血がほ乳動物由来のものである、請求項1～22のいずれか1項に記載の細胞。

24. ほ乳動物がマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サルおよびヒトから選ばれる1種である、請求項23記載の細胞。

25. 細胞が、マウス骨髄由来多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)である、請求項1～8のいずれか1項に記載の細胞。

26. 染色体DNAの脱メチル化により心筋細胞に分化する能力を有する、請求項1～25のいずれか1項に記載の細胞。

27. 染色体DNAの脱メチル化が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびジメチルスルフォキシド(DMSO)からなる群から選ばれる少なくとも1種によるものであることを特徴とする、請求項26記載の細胞。

28. デメチラーゼが、配列番号1記載で表されるアミノ酸配列を有するデメチラーゼである、請求項27記載の細胞。

29. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心

筋細胞への分化に働く因子により心筋細胞への分化が促進される請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。

30. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項29記載の細胞。

31. サイトカインが血小板由来増殖因子(PDGF)、繊維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項30記載の細胞。

32. PDGF が配列番号3または5で表されるアミノ酸配列、FGF-8 が配列番号64で表されるアミノ酸配列、ET1 が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4 が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項31記載の細胞。

33. 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項30記載の細胞。

34. ビタミンがレチノイン酸である、請求項30記載の細胞。

35. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項30記載の細胞。

36. Nkx2.5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表されるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項35記載の細胞。

37. 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする請求項30記載の細胞。

38. 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)により心筋細胞への分化が抑制される請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。
39. FGF-2 が配列番号7または8記載のアミノ酸配列を有する FGF-2 である、請求項38記載の細胞。
40. 心臓に移植することにより心筋細胞または血管に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。
41. 胚盤胞に移植すること、または心筋細胞と共培養を行うことにより、心筋に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。
42. 核内受容体 PPAR- γ を活性化因子により脂肪細胞に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。
43. 核内受容体 PPAR- γ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする請求項42記載の細胞。
44. チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項43記載の細胞。
45. 胚盤胞に移植すること、または脳または脊髄に移植することにより、神経系細胞に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。
46. 胚盤胞に移植すること、または肝臓に移植することにより、肝細胞に分化する能力を有する請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞。
47. 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞から心筋を形成する方法。
48. 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、請求項9記載の細胞から請求項12記載の細胞へ脱分化させる方法。
49. 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、CD 117陰性および CD 140陽性の細胞から請求項8記載の細胞へ脱分化させる方法。
50. 染色体 DNA の脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項48および49記載の方法。
51. デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、請

求項50記載の方法。

52. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を用いることを特徴とする、請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞から心筋を形成する方法。

53. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項52記載の方法。

54. サイトカインがPDGF、繊維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項53記載の方法。

55. PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64のアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項54記載の方法。

56. 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項53記載の方法。

57. ビタミンがレチノイン酸である、請求項53記載の方法。

58. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項53記載の方法。

59. Nkx2.5/Csxが配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4が配列番号11で表されるアミノ酸配列、MEF-2Aが配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2Bが配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2Cが配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2Dが配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHANDが配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHANDが配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有する、MesP1が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求

項58記載の方法。

60. 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする請求項53記載の方法。

61. 核内受容体 PPAR- γ を活性化する因子を用いることを特徴とする、請求項1～28のいずれか1項に記載の細胞から脂肪細胞を分化させる方法。

62. 核内受容体 PPAR- γ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする請求項61記載の方法。

63. チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項62記載の方法。

64. 染色体 DNA の脱メチル化剤を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。

65. 染色体 DNA の脱メチル化剤がデメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項64記載の心筋形成剤。

66. デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、請求項65記載の心筋形成剤。

67. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を有効成分として含有する心筋形成剤。

68. 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項67記載の心筋形成剤。

69. サイトカインが PDGF、繊維芽細胞増殖因子8 (FGF-8)、エンドセリン1 (ET1)、ミドカイン (Midkine)、骨形成因子4 (BMP-4) からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項68記載の心筋形成剤。

70. PDGF が配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8 が配列番号64のアミノ酸配列、ET1 が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4 が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、請求項69記載の心筋形成剤。

71. 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項68記載の心筋形成剤。

72. ビタミンがレチノイン酸である、請求項71記載の心筋形成剤。

73. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項68記載の心筋形成剤。

74. Nkx2.5/Csx が配列番号9記載のアミノ酸配列で表される、GATA4 が配列番号11記載のアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13記載のアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15記載のアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17記載のアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19記載のアミノ酸配列、dHAND が配列番号21記載のアミノ酸配列、eHAND が配列番号23記載のアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25記載のアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27記載のアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29記載のアミノ酸配列、MesP1 が配列番号62記載のアミノ酸配列でそれぞれ表される、請求項73記載の心筋形成剤。

75. 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする請求項68記載の心筋形成剤。

76. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、心臓疾患により破壊された心臓を再生する方法。

77. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を有効成分とする心臓再生薬。

78. 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子を心筋へ特異的に輸送する方法。

79. 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

80. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を免疫原として用いることを特徴とする、該細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

81. 請求項80記載の方法で取得された抗体を用いることを特徴とする、請求項1～48のいずれか1項に記載の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法。

82. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞に

特異的な表面抗原を取得する方法。

83. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法。

84. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞の心筋細胞への分化を誘導する因子をスクリーニングする方法。

85. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を不死化する因子をスクリーニングする方法。

86. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞にテロメラーゼを発現させることを特徴とする、該細胞の不死化方法。

87. テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである請求項86記載の方法。

88. テロメラーゼを発現させることにより、不死化させた請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

89. テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである請求項88記載の治療薬。

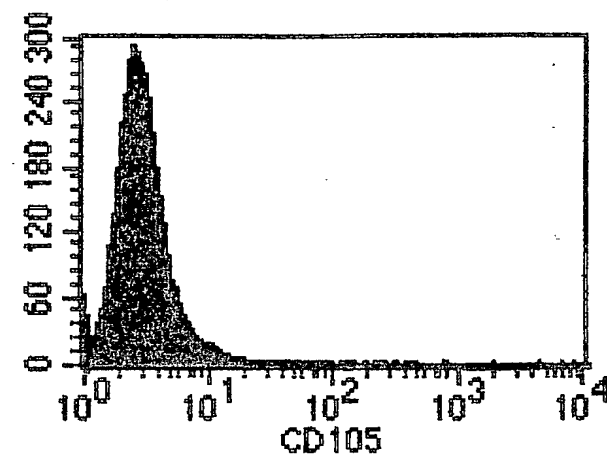
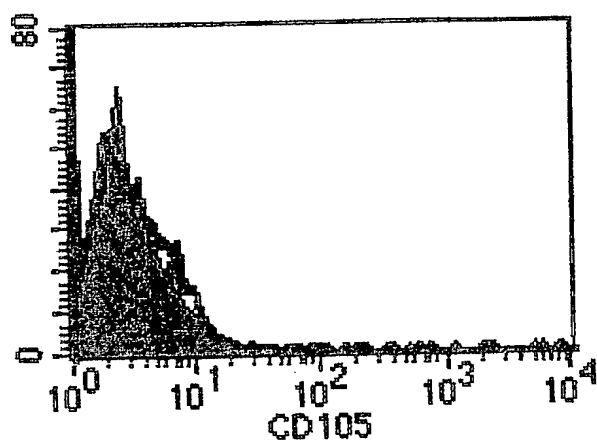
90. 請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を含んだ培養上清。

91. 請求項90記載の培養上清を用いることを特徴とする、請求項1～46のいずれか1項に記載の細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

第1図

A

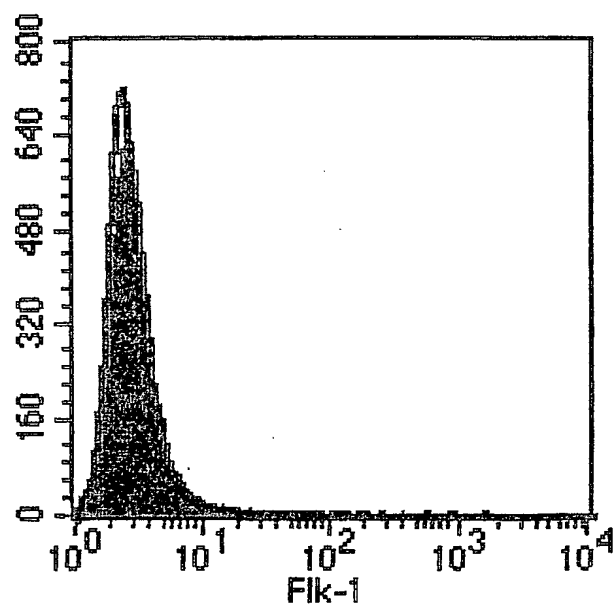
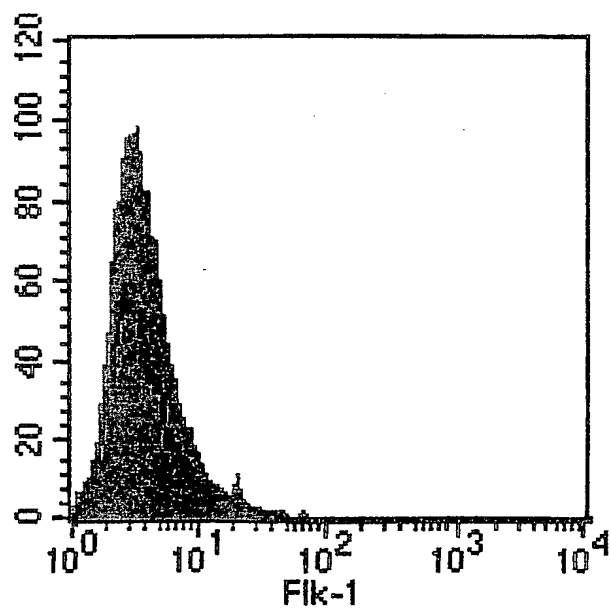
B



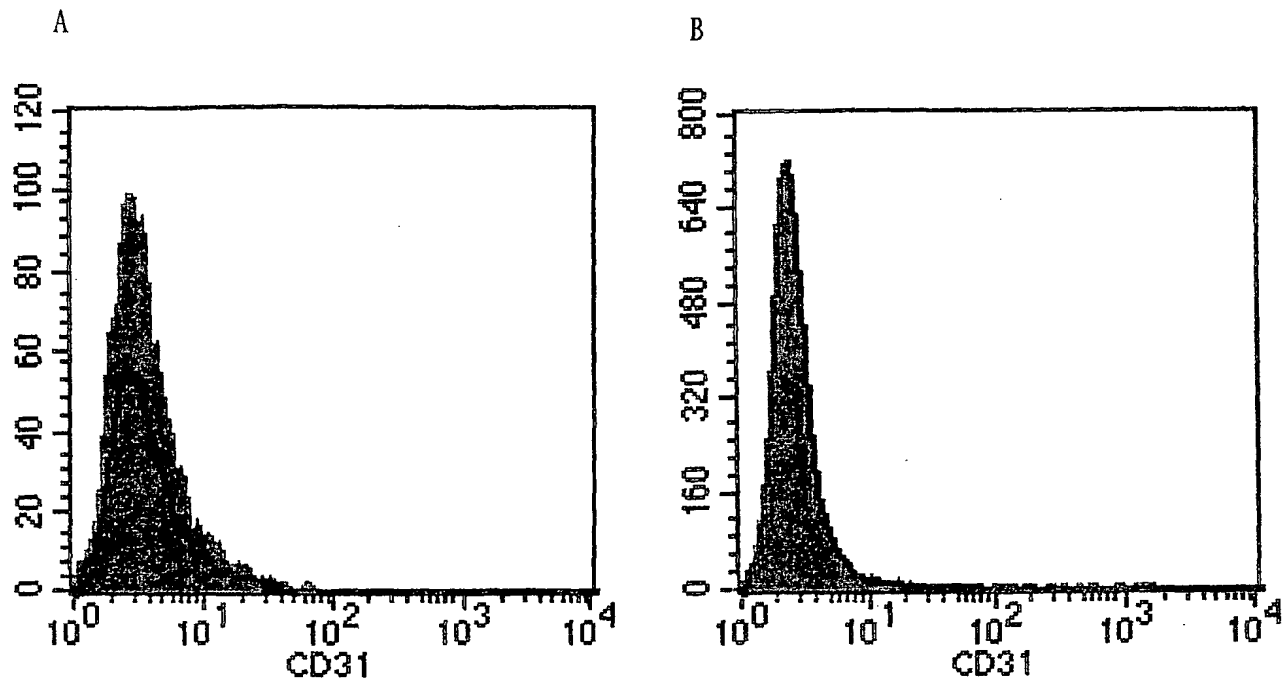
第2図

A

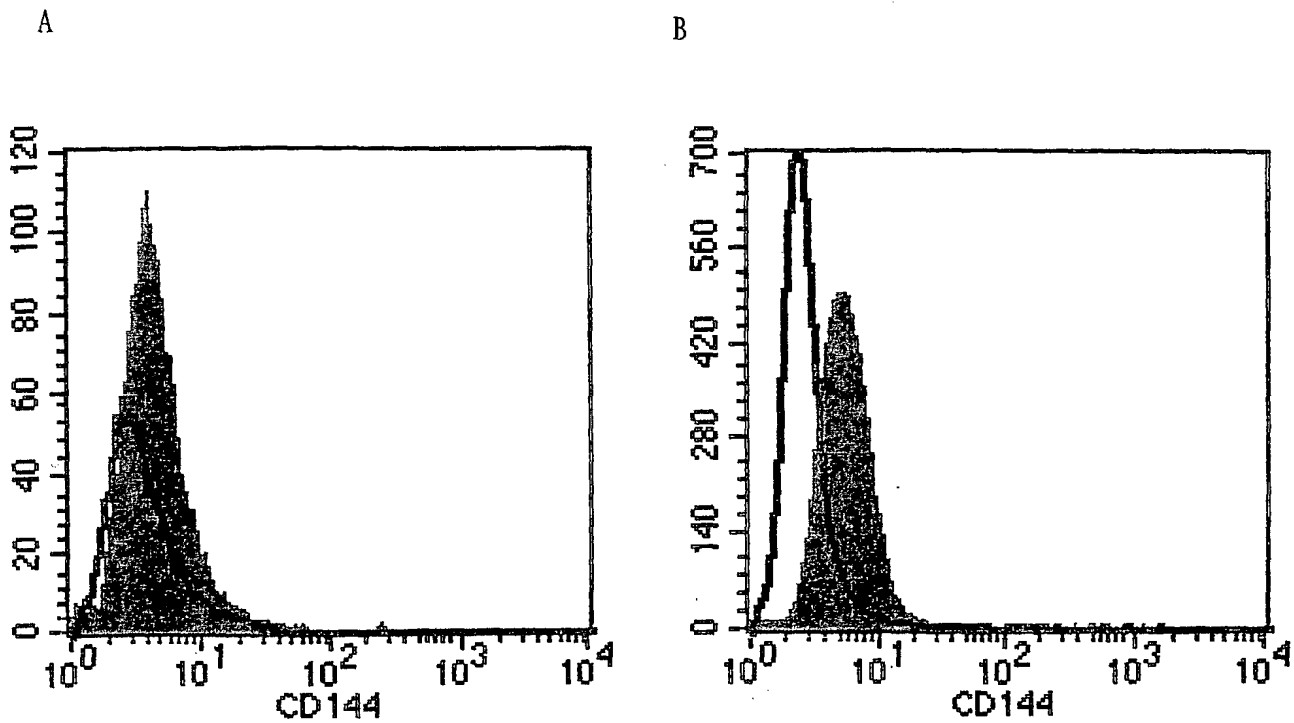
B



第3図

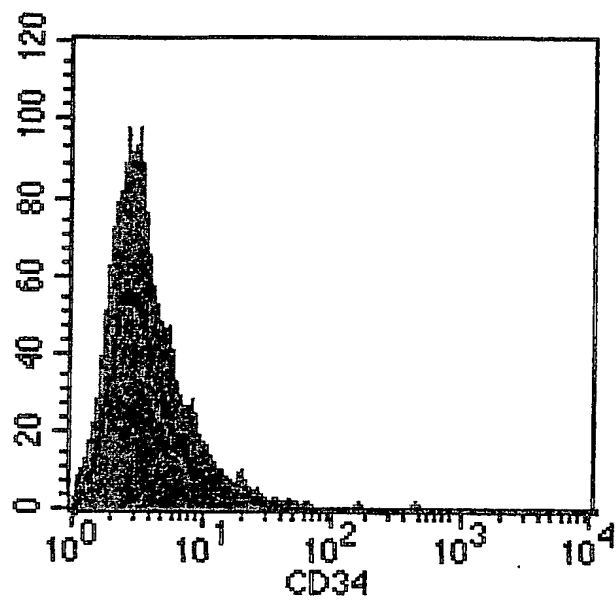


第4図

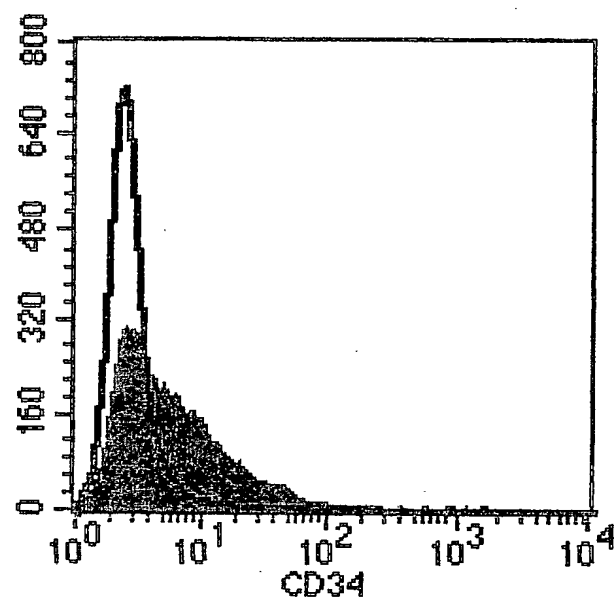


第5図

A

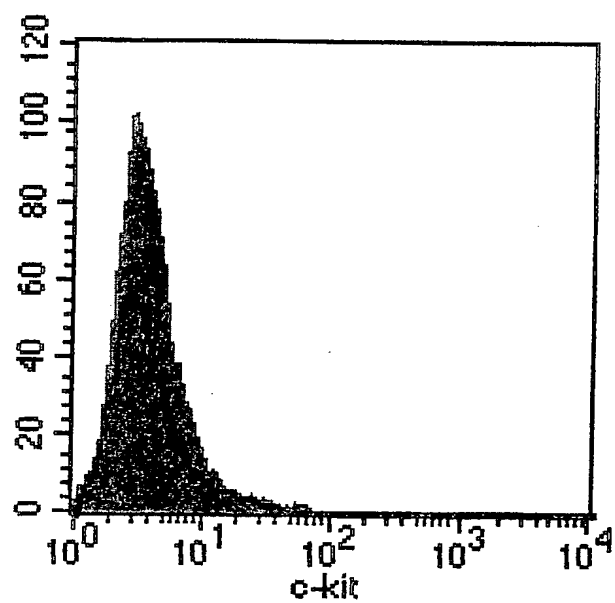


B

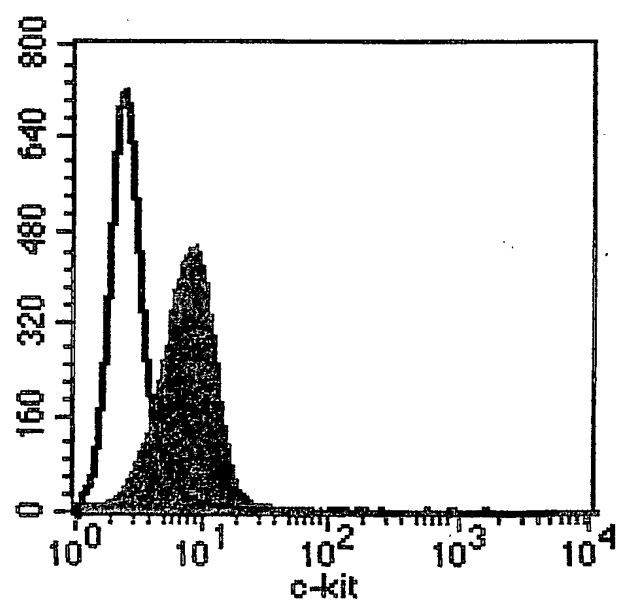


第6図

A



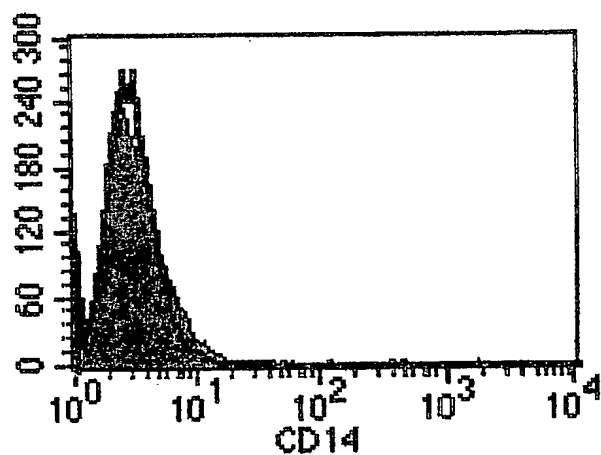
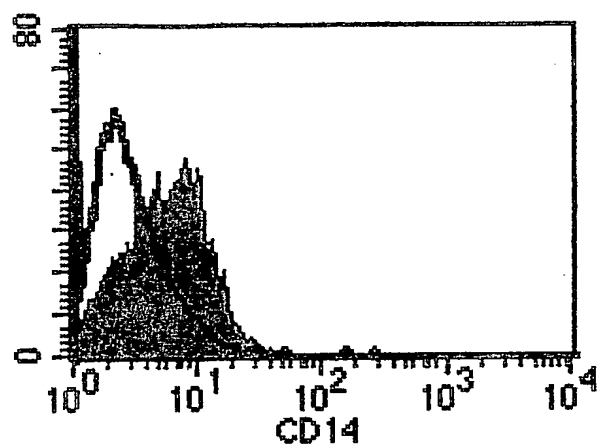
B



第7図

A

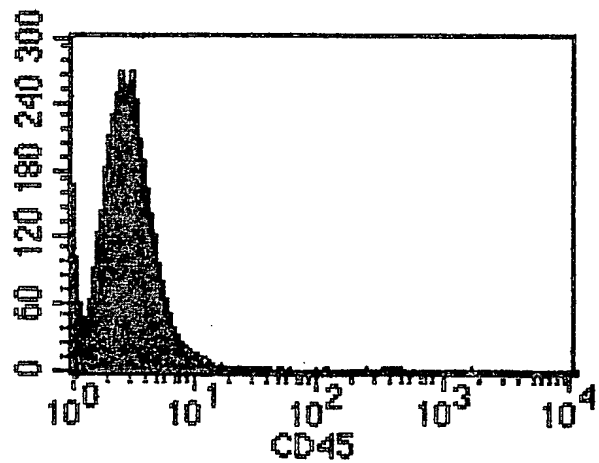
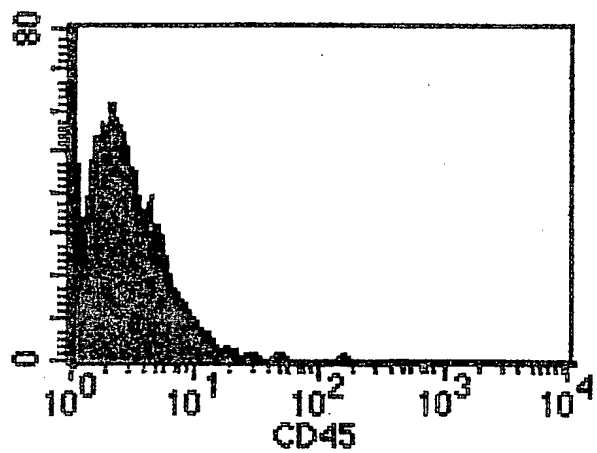
B



第8図

A

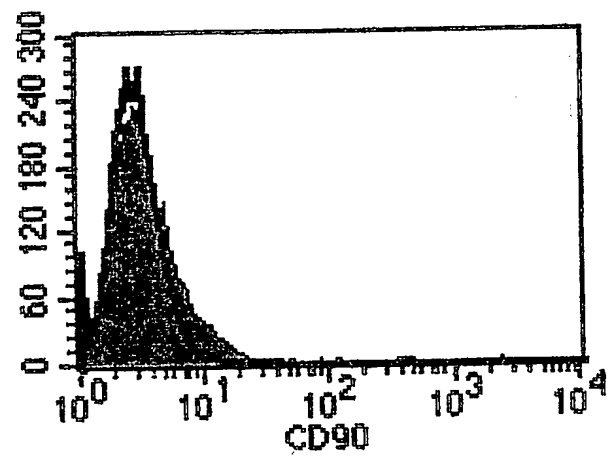
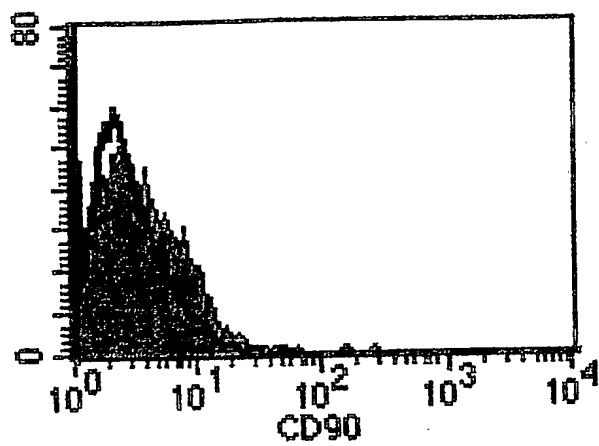
B



第 9 図

A

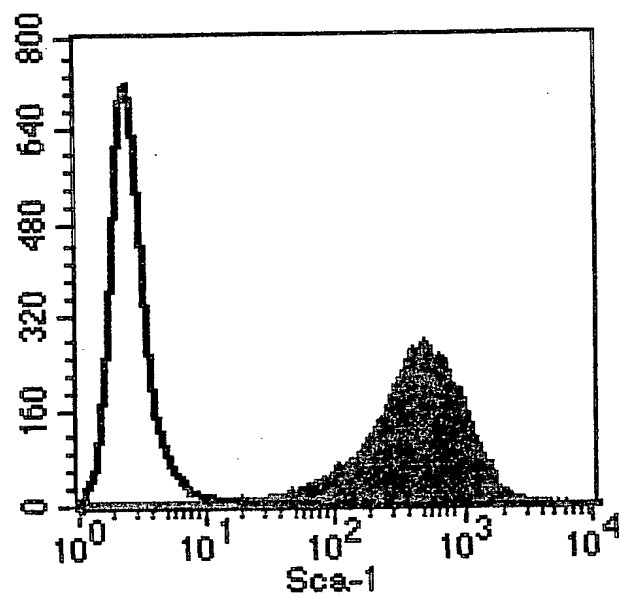
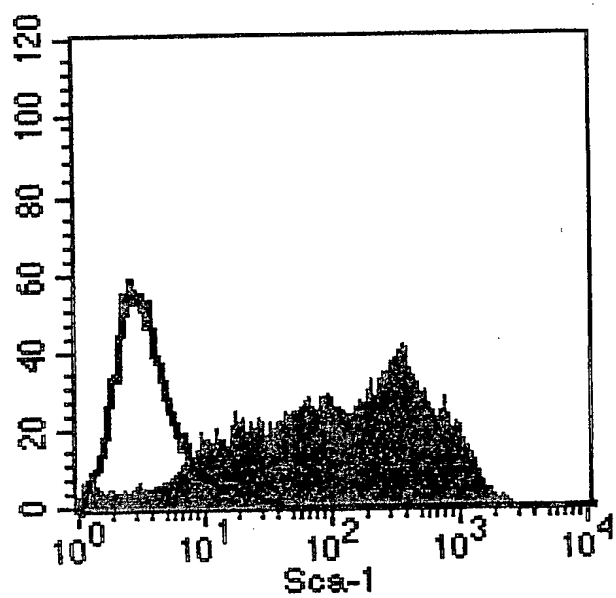
B



第 10 図

A

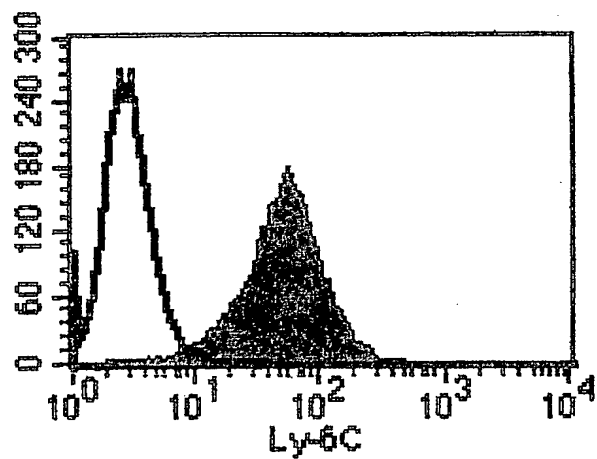
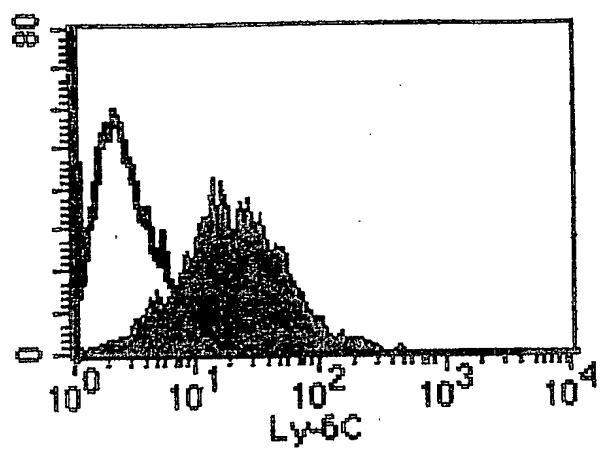
B



第 1 1 図

A

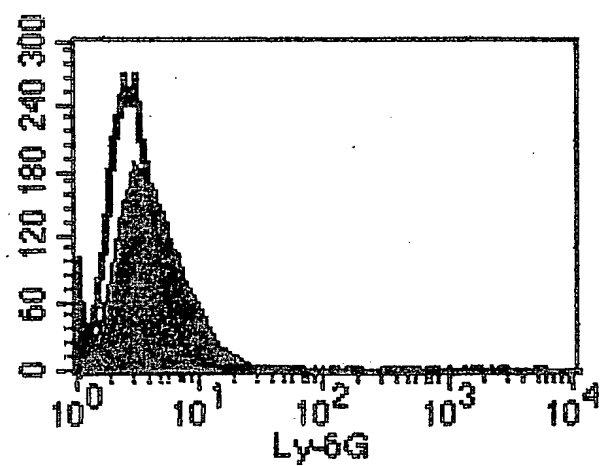
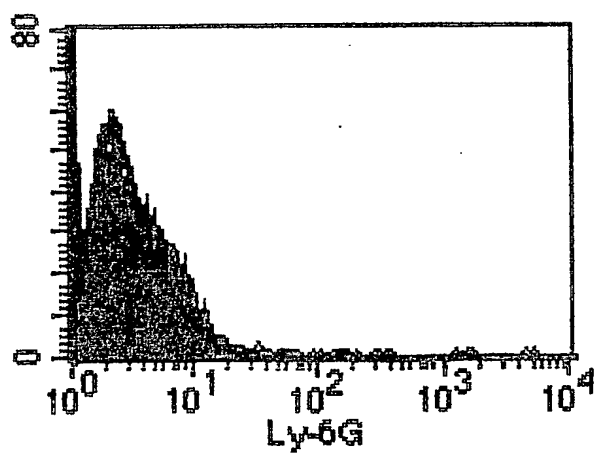
B



第 1 2 図

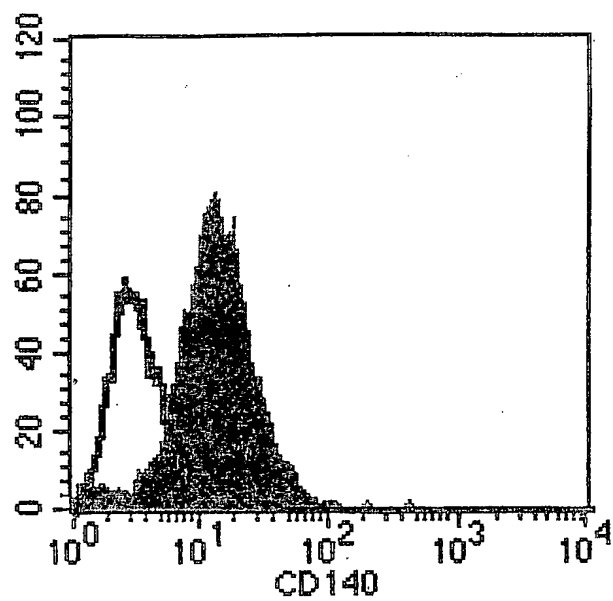
A

B

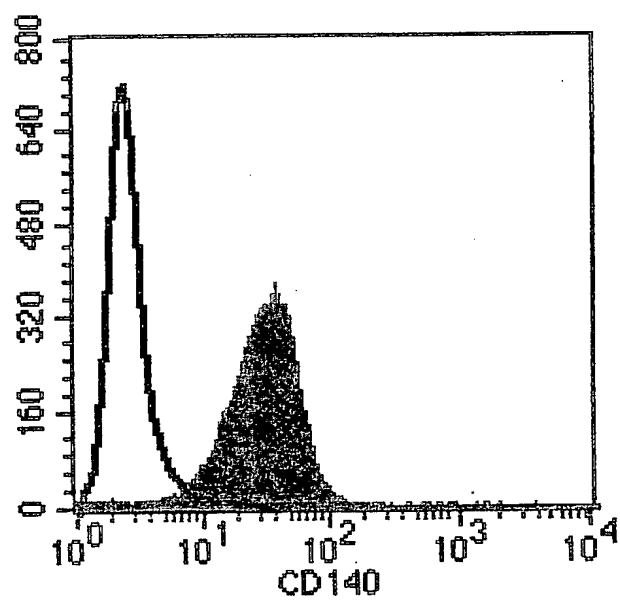


第 1 3 図

A

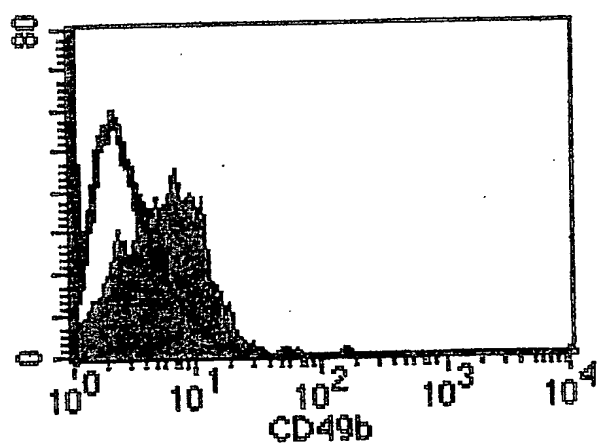


B

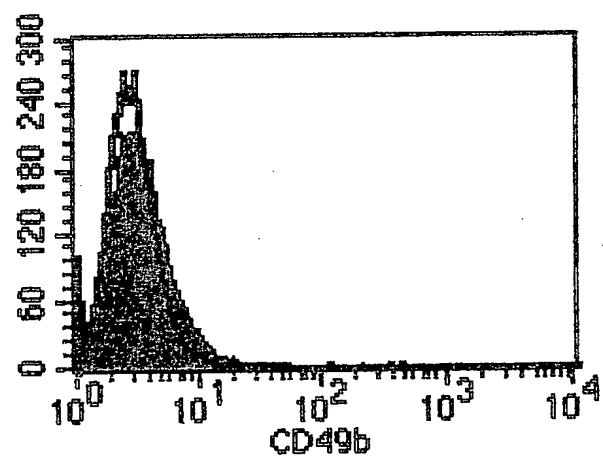


第 1 4 図

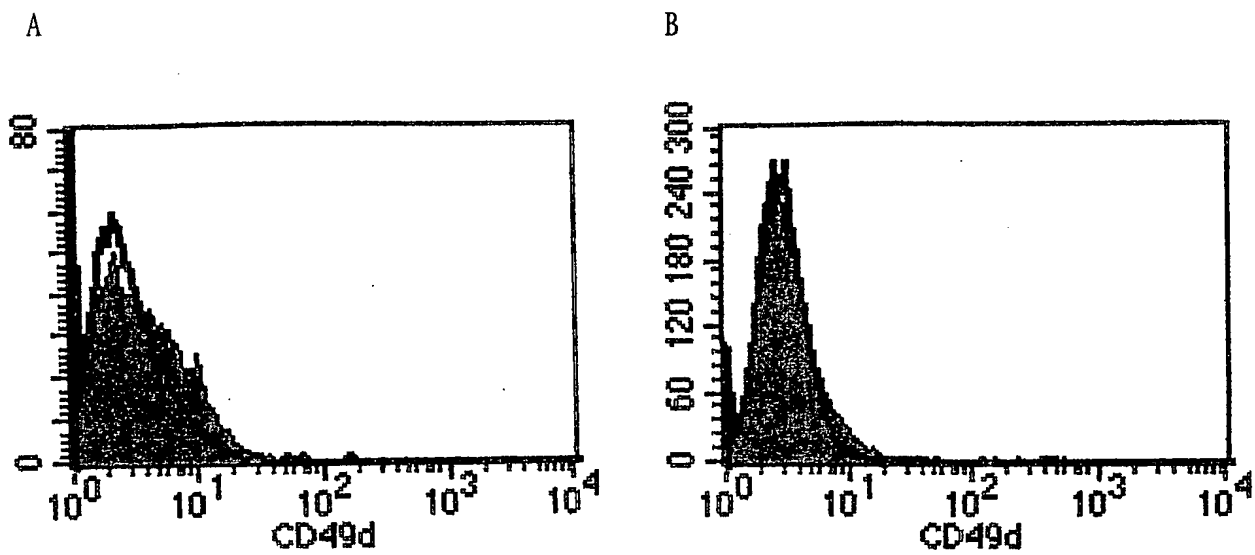
A



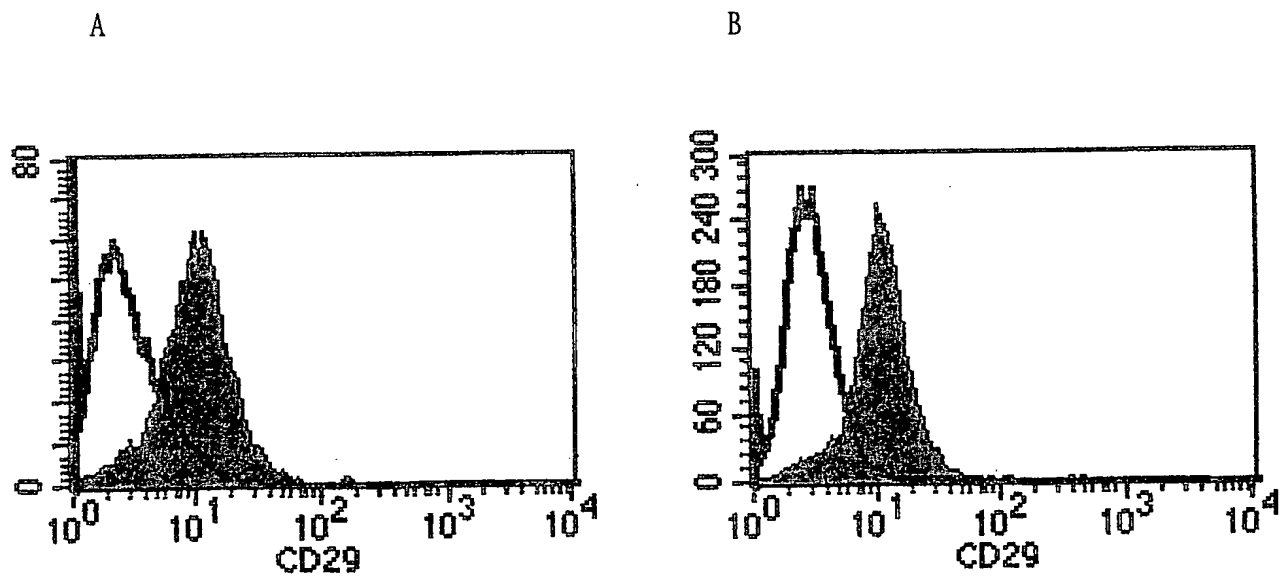
B



第 1 5 図



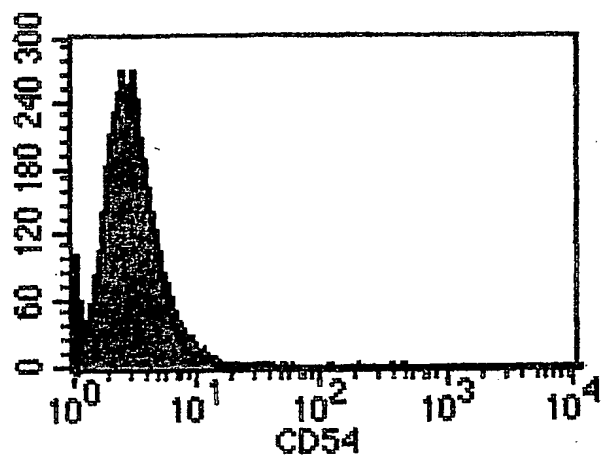
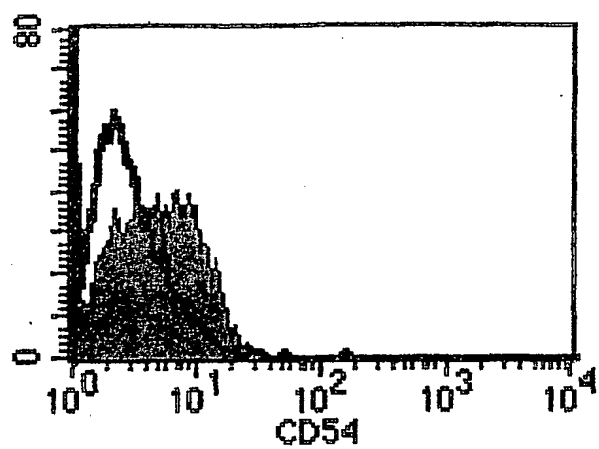
第 1 6 図



第 1 7 図

A

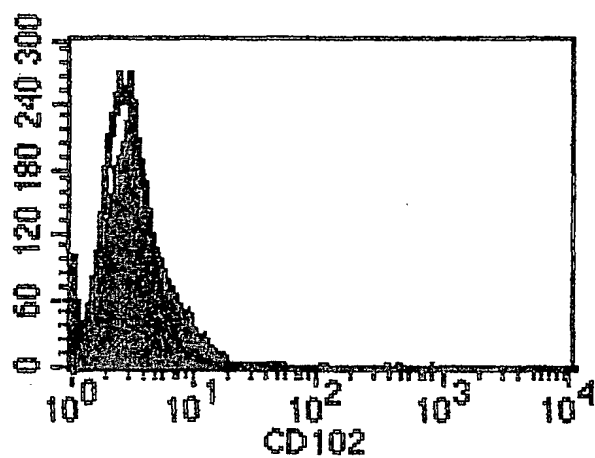
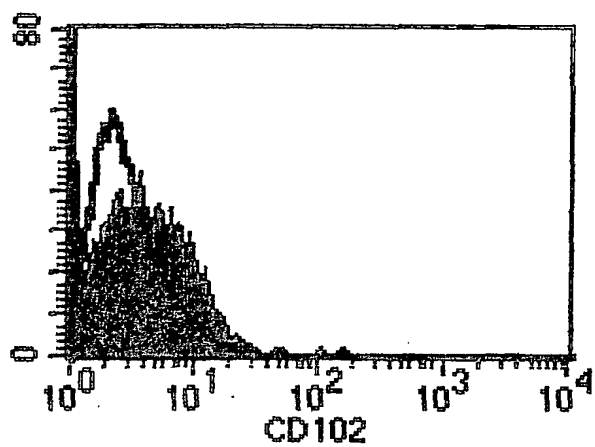
B



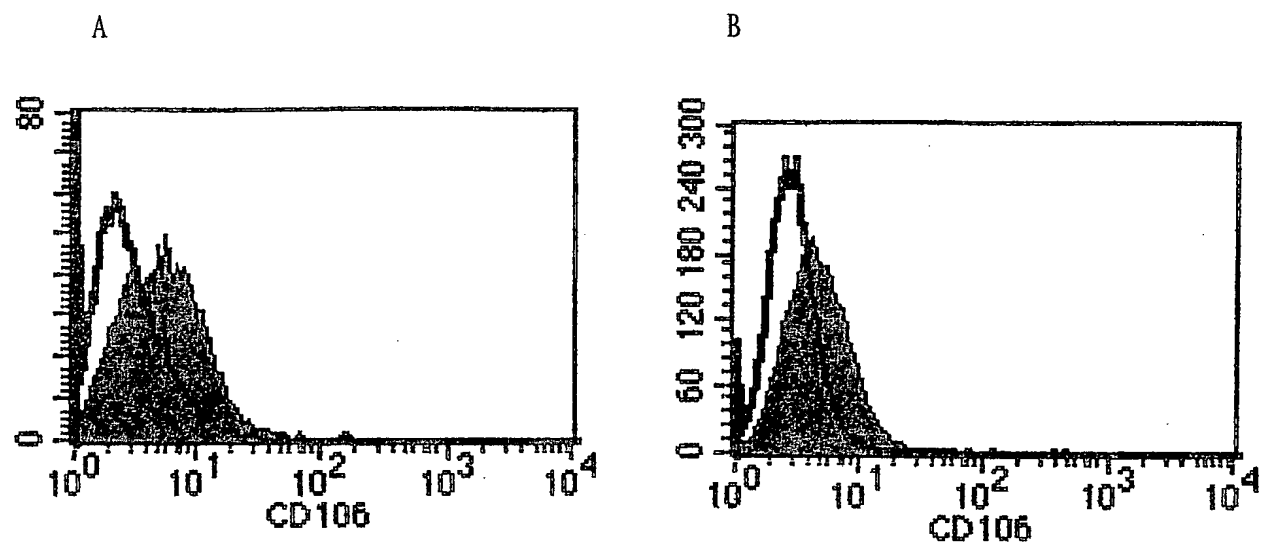
第 1 8 図

A

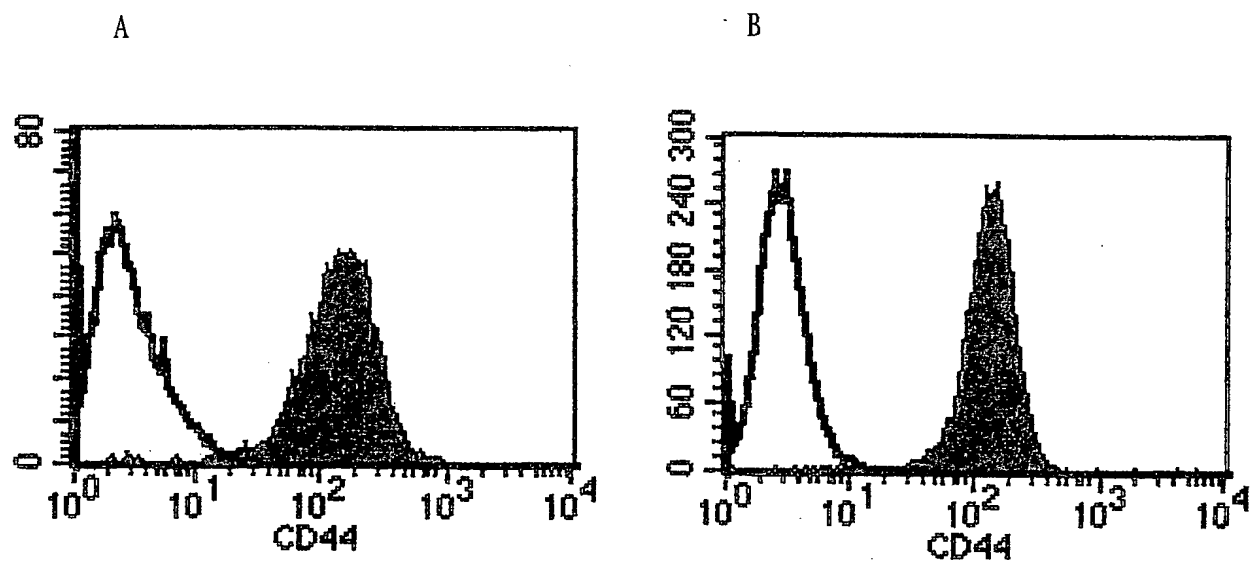
B



第 19 図



第 20 図



配 列 表

SEQUENCING LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<111> THE CELL HAVING THE POTENTIALITY OF DIFFERENTIATION INTO
CARDIOMYOCYTES

<130> 11217W03

<140>

<141>

<150> H11-372826

<151> 1999-12-28

<150> PCT-JP00-01148

<151> 2000-02-28

<150> PCT-JP00-07741

<151> 2000-11-02

<160>80

<170> PatentIn Ver.2.0

<210> 1

<211> 411

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Arg	Ala	His	Pro	Gly	Gly	Gly	Arg	Cys	Cys	Pro	Glu	Gln	Glu	Glu
1				5				10					15		
Gly	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile
			20					25					30		
Glu	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly	Ser	Ala	Leu	Ala	Pro	Ser	Pro	Val	Ser	Gly
			35					40					45		

Val	Arg	Arg	Glu	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Trp
50						55					60				
Lys	Gln	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Val	Cys	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg
65					70					75				80	
Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg
				85					90					95	
Pro	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Cys	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Arg	Arg	Glu	Pro	Val	Pro
		115					120					125			
Phe	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Arg	Ala	Thr
130						135					140				
Glu	Ser	Gly	Lys	Arg	Met	Asp	Cys	Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Trp	Lys
145					150					155				160	
Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Arg	Lys	Ser	Gly	Leu	Ser	Ala	Gly	Lys	Ser	Asp
				165					170					175	
Val	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys	Lys	Phe	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln
			180					185					190		
Leu	Ala	Arg	Tyr	Leu	Gly	Asn	Thr	Val	Asp	Leu	Ser	Ser	Phe	Asp	Phe
		195					200						205		
Arg	Thr	Gly	Lys	Met	Met	Pro	Ser	Lys	Leu	Gln	Lys	Asn	Lys	Gln	Arg
210						215						220			
Leu	Arg	Asn	Asp	Pro	Leu	Asn	Gln	Asn	Lys	Gly	Lys	Pro	Asp	Leu	Asn
225					230					235				240	
Thr	Thr	Leu	Pro	Ile	Arg	Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Val
				245				250						255	
Thr	Lys	Val	Thr	Asn	His	Pro	Ser	Asn	Lys	Val	Lys	Ser	Asp	Pro	Gln
			260					265					270		
Arg	Met	Asn	Glu	Gln	Pro	Arg	Gln	Leu	Phe	Trp	Glu	Lys	Arg	Leu	Gln
		275					280						285		
Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	Thr	Glu	Gln	Ile	Ile	Lys	Thr	Met	Glu
		290				295						300			
Leu	Pro	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gly	Pro	Gly	Ser	Asn	Asp	Glu	Thr
305					310					315				320	
Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	His	Thr	Ser	Ser	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	

Thr Gly Gln Val Ser Ala Ala Val Glu Lys Asn Pro Ala Val Trp Leu
 340 345 350
 Asn Thr Ser Gln Pro Leu Cys Lys Ala Phe Ile Val Thr Asp Glu Asp
 355 360 365
 Ile Arg Lys Gln Glu Glu Arg Val Gln Gln Val Arg Lys Lys Leu Glu
 370 375 380
 Glu Ala Leu Met Ala Asp Ile Leu Ser Arg Ala Ala Asp Thr Glu Glu
 385 390 395 400
 Met Asp Ile Glu Met Asp Ser Gly Asp Glu Ala
 405 410

<210> 2

<211> 1233

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1236)

<400> 2

atg cgc gcg cac ccg ggg gga ggc cgc tgc tgc ccg gag cag gag gag 48
 Met Arg Ala His Pro Gly Gly Gly Arg Cys Cys Pro Glu Gln Glu Glu
 1 5 10 15
 ggg gag agt gcg gcg ggc ggc agc ggc gct ggc ggc gac tcc gcc ata 96
 Gly Glu Ser Ala Ala Gly Gly Ser Gly Ala Gly Gly Asp Ser Ala Ile
 20 25 30
 gag cag ggg ggc cag ggc agc gcg ctc gcc ccg tcc ccg gtg agc ggc 144
 Glu Gln Gly Gly Gln Gly Ser Ala Leu Ala Pro Ser Pro Val Ser Gly
 35 40 45
 gtg cgc agg gaa ggc gct cgg ggc ggc ggc cgt ggc cgg ggg cgg tgg 192
 Val Arg Arg Glu Gly Ala Arg Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Trp
 50 55 60
 aag cag gcg ggc cgg ggc ggc ggc gtc tgt ggc cgt ggc cgg ggc cgg 240
 Lys Gln Ala Gly Arg Gly Gly Gly Val Cys Gly Arg Gly Arg Gly Arg
 65 70 75 80
 ggc cgt ggc cgg gga cgg gga cgg ggc cgg ggc cgg ggc cgc ggc cgt 288
 Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg
 85 90 95

ccc ccg agt ggc ggc agc ggc ctt ggc ggc gac ggc ggc ggc tgc ggc	336
Pro Pro Ser Gly Gly Ser Gly Leu Gly Gly Asp Gly Gly Gly Cys Gly	
100 105 110	
ggc ggc ggc agc ggt ggc ggc ggc gcc ccc cgg cgg gag ccg gtc cct	384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Pro Arg Arg Glu Pro Val Pro	
115 120 125	
ttc ccg tcg ggg agc gcg ggg ccg ggg ccc agg gga ccc cgg gcc acg	432
Phe Pro Ser Gly Ser Ala Gly Pro Gly Pro Arg Gly Pro Arg Ala Thr	
130 135 140	
gag agc ggg aag agg atg gat tgc ccg gcc ctc ccc ccc gga tgg aag	480
Glu Ser Gly Lys Arg Met Asp Cys Pro Ala Leu Pro Pro Gly Trp Lys	
145 150 155 160	
aag gag gaa gtg atc cga aaa tct ggg cta agt gct ggc aag agc gat	528
Lys Glu Glu Val Ile Arg Lys Ser Gly Leu Ser Ala Gly Lys Ser Asp	
165 170 175	
gtc tac tac ttc agt cca agt ggt aag aag ttc aga agc aag cct cag	576
Val Tyr Tyr Phe Ser Pro Ser Gly Lys Lys Phe Arg Ser Lys Pro Gln	
180 185 190	
ttg gca agg tac ctg gga aat act gtt gat ctc agc agt ttt gac ttc	624
Leu Ala Arg Tyr Leu Gly Asn Thr Val Asp Leu Ser Ser Phe Asp Phe	
195 200 205	
aga act gga aag atg atg cct agt aaa tta cag aag aac aaa cag aga	672
Arg Thr Gly Lys Met Met Pro Ser Lys Leu Gln Lys Asn Lys Gln Arg	
210 215 220	
ctg cga aac gat cct ctc aat caa aat aag ggt aaa cca gac ttg aat	720
Leu Arg Asn Asp Pro Leu Asn Gln Asn Lys Gly Lys Pro Asp Leu Asn	
225 230 235 240	
aca aca ttg cca att aga caa aca gca tca att ttc aaa caa ccg gta	768
Thr Thr Leu Pro Ile Arg Gln Thr Ala Ser Ile Phe Lys Gln Pro Val	
245 250 255	
acc aaa gtc aca aat cat cct agt aat aaa gtg aaa tca gac cca caa	816
Thr Lys Val Thr Asn His Pro Ser Asn Lys Val Lys Ser Asp Pro Gln	
260 265 270	
cga atg aat gaa cag cca cgt cag ctt ttc tgg gag aag agg cta caa	864
Arg Met Asn Glu Gln Pro Arg Gln Leu Phe Trp Glu Lys Arg Leu Gln	
275 280 285	

gga ctt agt gca tca gat gta aca gaa caa att ata aaa acc atg gaa 912
 Gly Leu Ser Ala Ser Asp Val Thr Glu Gln Ile Ile Lys Thr Met Glu
 290 295 300
 cta ccc aaa ggt ctt caa gga gtt ggt cca ggt agc aat gat gag acc 960
 Leu Pro Lys Gly Leu Gln Gly Val Gly Pro Gly Ser Asn Asp Glu Thr
 305 310 315 320
 ctt tta tct gct gtt gcc agt gct ttg cac aca agc tct gcg cca atc 1008
 Leu Leu Ser Ala Val Ala Ser Ala Leu His Thr Ser Ser Ala Pro Ile
 325 330 335
 aca ggg caa gtc tcc gct gct gtg gaa aag aac cct gct gtt tgg ctt 1056
 Thr Gly Gln Val Ser Ala Ala Val Glu Lys Asn Pro Ala Val Trp Leu
 340 345 350
 aac aca tct caa ccc ctc tgc aaa gct ttt att gtc aca gat gaa gac 1104
 Asn Thr Ser Gln Pro Leu Cys Lys Ala Phe Ile Val Thr Asp Glu Asp
 355 360 365
 atc agg aaa cag gaa gag cga gta cag caa gta cgc aag aaa ttg gaa 1152
 Ile Arg Lys Gln Glu Glu Arg Val Gln Gln Val Arg Lys Lys Leu Glu
 370 375 380
 gaa gca ctg atg gca gac atc ttg tcg cga gct gct gat aca gaa gag 1200
 Glu Ala Leu Met Ala Asp Ile Leu Ser Arg Ala Ala Asp Thr Glu Glu
 385 390 395 400
 atg gat att gaa atg gac agt gga gat gaa gcc 1233
 Met Asp Ile Glu Met Asp Ser Gly Asp Glu Ala
 405 410

<210> 3

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30
 Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45
 Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg

50 55 60
 Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
 100 105 110
 Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
 115 120 125
 Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
 130 135 140
 Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
 165 170 175
 Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
 180 185 190
 Thr Asp Val Arg
 195

<210> 4

<211> 588

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(591)

<400> 4

atg agg acc ttg gct tgc ctg ctg ctc ctc ggc tgc gga tac ctc gcc 48
 Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 cat gtt ctg gcc gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtg atc gag agg 96
 His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30
 ctg gcc cgc agt cag atc cac agc atc cgg gac ctc cag cga ctc ctg 144
 Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45

gag ata gac tcc gta ggg agt gag gat tct ttg gac acc agc ctg aga 192
 Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
 50 55 60
 gct cac ggg gtc cac gcc act aag cat gtg ccc gag aag cgg ccc ctg 240
 Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
 65 70 75 80
 ccc att cgg agg aag aga agc atc gag gaa gct gtc ccc gct gtc tgc 288
 Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
 85 90 95
 aag acc agg acg gtc att tac gag att cct cgg agt cag gtc gac ccc 336
 Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
 100 105 110
 acg tcc gcc aac ttc ctg atc tgg ccc ccg tgc gtg gag gtg aaa cgc 384
 Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
 115 120 125
 tgc acc ggc tgc tgc aac acg agc agt gtc aag tgc cag ccc tcc cgc 432
 Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
 130 135 140
 gtc cac cac cgc agc gtc aag gtg gcc aag gtg gaa tac gtc agg aag 480
 Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
 145 150 155 160
 aag cca aaa tta aaa gaa gtc cag gtg agg tta gag gag cat ttg gag 528
 Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
 165 170 175
 tgc gcc tgc gcg acc aca agc ctg aat ccg gat tat cgg gaa gag gac 576
 Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
 180 185 190
 acg gat gtg agg 588
 Thr Asp Val Arg
 195
 <210> 5
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg

1	5	10	15
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met			
20	25	30	
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu			
35	40	45	
His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met			
50	55	60	
Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg			
65	70	75	80
Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu			
85	90	95	
Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp			
100	105	110	
Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln			
115	120	125	
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr			
130	135	140	
Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg			
145	150	155	160
Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu			
165	170	175	
Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser			
180	185	190	
Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val			
195	200	205	
Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg			
210	215	220	
Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly			
225	230	235	240

Ala

<210> 6

<211> 723

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(726)

<400> 6

atg aat cgc tgc tgg gcg ctc ttc ctg tct ctc tgc tgc tac ctg cgt	48
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg	
1 5 10 15	
ctg gtc agc gcc gag ggg gac ccc att ccc gag gag ctt tat gag atg	96
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met	
20 25 30	
ctg agt gac cac tcg atc cgc tcc ttt gat gat ctc caa cgc ctg ctg	144
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu	
35 40 45	
cac gga gac ccc gga gag gaa gat ggg gcc gag ttg gac ctg aac atg	192
His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met	
50 55 60	
acc cgc tcc cac tct gga ggc gag ctg gag agc ttg gct cgt gga aga	240
Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg	
65 70 75 80	
agg agc ctg ggt tcc ctg acc att gct gag ccg gcc atg atc gcc gag	288
Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu	
85 90 95	
tgc aag acg cgc acc gag gtg ttc gag atc tcc cgg cgc ctc ata gac	336
Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp	
100 105 110	
cgc acc aac gcc aac ttc ctg gtg tgg ccg ccc tgt gtg gag gtg cag	384
Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln	
115 120 125	
cgc tgc tcc ggc tgc tgc aac aac cgc aac gtg cag tgc cgc ccc acc	432
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr	
130 135 140	
cag gtg cag ctg cga cct gtc cag gtg aga aag atc gag att gtg cgg	480
Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg	
145 150 155 160	
aag aag cca atc ttt aag aag gcc acg gtg acg ctg gaa gac cac ctg	528
Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu	
165 170 175	
gca tgc aag tgt gag aca gtg gca gct gca cgg cct gtg acc cga agc	576

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser
 180 185 190
 ccg ggg ggt tcc cag gag cag cga gcc aaa acg ccc caa act cgg gtg 624
 Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val
 195 200 205
 acc att cgg acg gtg cga gtc cgc cgg ccc ccc aag ggc aag cac cgg 672
 Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
 210 215 220
 aaa ttc aag cac acg cat gac aag acg gca ctg aag gag acc ctt gga 720
 Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
 225 230 235 240
 gcc 723
 Ala
 <210> 7
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu
 20 25 30
 Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu
 50 55 60
 Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn
 65 70 75 80
 Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys
 85 90 95
 Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr
 100 105 110
 Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys
 115 120 125
 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys
 130 135 140

Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser

145

150

<210> 8

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(468)

<400> 8

atg gca gcc ggg agc atc acc acg ctg ccc gcc ttg ccc gag gat ggc	48
Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly	
1 5 10 15	
ggc agc ggc gcc ttc ccg ccc ggc cac ttc aag gac ccc aag cgg ctg	96
Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu	
20 25 30	
tac tgc aaa aac ggg ggc ttc ttc ctg cgc atc cac ccc gac ggc cga	144
Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg	
35 40 45	
gtt gac ggg gtc cgg gag aag agc gac cct cac atc aag cta caa ctt	192
Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu	
50 55 60	
caa gca gaa gag aga gga gtt gtg tct atc aaa gga gtg tgt gct aac	240
Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn	
65 70 75 80	
cgt tac ctg gct atg aag gaa gat gga aga tta ctg gct tct aaa tgt	288
Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys	
85 90 95	
gtt acg gat gag tgt ttc ttt ttt gaa cga ttg gaa tct aat aac tac	336
Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr	
100 105 110	
aat act tac cgg tca agg aaa tac acc agt tgg tat gtg gca ttg aaa	384
Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys	
115 120 125	
cga act ggg cag tat aaa ctt gga tcc aaa aca gga cct ggg cag aaa	432
Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys	

130 135 140 465
 gct ata ctt ttt ctt cca atg tct gct aag agc
 Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
 145 150 155
 <210> 9
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Ala Gly Glu
 20 25 30
 Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ser Ser Cys Met Leu
 35 40 45
 Ala Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro
 50 55 60
 Gly Leu Pro Glu Leu Arg Ala Glu Leu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Ala
 65 70 75 80
 Lys Cys Ala Ser Ala Phe Pro Ala Ala Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala
 85 90 95
 Tyr Ser Asp Pro Asp Pro Ala Lys Asp Pro Arg Ala Glu Lys Lys Glu
 100 105 110
 Leu Cys Ala Leu Gln Lys Ala Val Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp
 115 120 125
 Asn Ala Glu Arg Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu
 130 135 140
 Phe Ser Gln Ala Gln Val Tyr Glu Leu Glu Arg Arg Phe Lys Gln Gln
 145 150 155 160
 Arg Tyr Leu Ser Ala Pro Glu Arg Asp Gln Leu Ala Ser Val Leu Lys
 165 170 175
 Leu Thr Ser Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys
 180 185 190
 Cys Lys Arg Gln Arg Gln Asp Gln Thr Leu Glu Leu Val Gly Leu Pro
 195 200 205
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Leu Val

210 215 220
 Arg Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Asp Ser Ala Pro Tyr Ala Pro Ala
 225 230 235 240
 Tyr Gly Val Gly Leu Asn Pro Tyr Gly Tyr Asn Ala Tyr Pro Ala Tyr
 245 250 255
 Pro Gly Tyr Gly Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala
 260 265 270
 Ala Tyr Pro Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Ala
 275 280 285
 Asn Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln
 290 295 300
 Ser Pro Gly Ile Pro Gln Ser Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly
 305 310 315 320
 Ile Arg Ala Trp

<210> 10

<211> 972

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(975)

<400> 10

atg ttc ccc agc cct gct ctc acg ccc acg ccc ttc tca gtc aaa gac 48
 Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp
 1 5 10 15
 atc cta aac ctg gaa cag cag cag cgc agc ctg gct gcc gcc gga gag 96
 Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Ala Gly Glu
 20 25 30
 ctc tct gcc cgc ctg gag gcg acc ctg gcg ccc tcc tcc tgc atg ctg 144
 Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ser Ser Cys Met Leu
 35 40 45
 gcc gcc ttc aag cca gag gcc tac gct ggg ccc gag gcg gct gcg ccg 192
 Ala Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro
 50 55 60
 ggc ctc cca gag ctg cgc gca gag ctg ggc cgc gcg cct tca ccg gcc 240

Gly	Leu	Pro	Glu	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gly	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Ala		
65					70				75					80			
aag	tgt	gcg	tct	gcc	ttt	ccc	gcc	gcc	ccc	gcc	ttc	tat	cca	cgt	gcc	288	
Lys	Cys	Ala	Ser	Ala	Phe	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Phe	Tyr	Pro	Arg	Ala		
				85					90					95			
tac	agc	gac	ccc	gac	cca	gcc	aag	gac	cct	aga	gcc	gaa	aag	aaa	gag	336	
Tyr	Ser	Asp	Pro	Asp	Pro	Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Ala	Glu	Lys	Lys	Glu		
			100					105					110				
ctg	tgc	gcg	ctg	cag	aag	gcg	gtg	gag	ctg	gag	aag	aca	gag	gcg	gac	384	
Leu	Cys	Ala	Leu	Gln	Lys	Ala	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	Thr	Glu	Ala	Asp		
		115				120					125						
aac	gcg	gag	cgg	ccc	cgg	gcg	cga	cgg	cgg	agg	aag	ccg	cgc	gtg	ctc	432	
Asn	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Pro	Arg	Val	Leu		
	130				135					140							
ttc	tcg	cag	gcg	cag	gtc	tat	gag	ctg	gag	cgg	cgc	ttc	aag	cag	cag	480	
Phe	Ser	Gln	Ala	Gln	Val	Tyr	Glu	Leu	Glu	Arg	Arg	Phe	Lys	Gln	Gln		
145				150				155				160					
cgg	tac	ctg	tcg	gcc	ccc	gaa	cgc	gac	cag	ctg	gcc	agc	gtg	ctg	aaa	528	
Arg	Tyr	Leu	Ser	Ala	Pro	Glu	Arg	Asp	Gln	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Lys		
			165					170				175					
ctc	acg	tcc	acg	cag	gtc	aag	atc	tgg	ttc	cag	aac	cgg	cgc	tac	aag	576	
Leu	Thr	Ser	Thr	Gln	Val	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Tyr	Lys		
			180					185				190					
tgc	aag	cgg	cag	cgg	cag	gac	cag	act	ctg	gag	ctg	gtg	ggg	ctg	ccc	624	
Cys	Lys	Arg	Gln	Arg	Gln	Asp	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Val	Gly	Leu	Pro		
	195				200			205									
ccg	ccg	ccg	ccg	ccg	cct	gcc	cgc	agg	atc	gcg	gtg	cca	gtg	ctg	gtg	672	
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Val		
	210				215			220									
cgc	gat	ggc	aag	cca	tgc	cta	ggg	gac	tcg	gcg	ccc	tac	gcg	cct	gcc	720	
Arg	Asp	Gly	Lys	Pro	Cys	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Pro	Tyr	Ala	Pro	Ala		
225				230				235				240					
tac	ggc	gtg	ggc	ctc	aat	ccc	tac	ggt	tat	aac	gcc	tac	ccc	gcc	tat	768	
Tyr	Gly	Val	Gly	Leu	Asn	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Ala	Tyr	Pro	Ala	Tyr		
			245					250				255					
ccg	ggt	tac	ggc	ggc	gcg	gcc	tgc	agc	cct	ggc	tac	agc	tgc	act	gcc	816	

Pro Gly Tyr Gly Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala
 260 265 270
 gct tac ccc gcc ggg cct tcc cca gcg cag ccg gcc act gcc gcc gcc 864
 Ala Tyr Pro Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Ala
 275 280 285
 aac aac aac ttc gtg aac ttc ggc gtc ggg gac ttg aat gcg gtt cag 912
 Asn Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln
 290 295 300
 agc ccc ggg att ccg cag agc aac tcg gga gtg tcc acg ctg cat ggt 960
 Ser Pro Gly Ile Pro Gln Ser Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly
 305 310 315 320
 atc cga gcc tgg 972
 Ile Arg Ala Trp
 324

<210> 11

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Tyr Gln Ser Leu Ala Met Ala Ala Asn His Gly Pro Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Tyr Gln Ala Gly Gly Pro Gly Pro Phe Met His Gly Ala Gly Ala
 20 25 30
 Ala Ser Ser Pro Val Tyr Leu Pro Thr Pro Arg Val Pro Ser Ser Val
 35 40 45
 Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ser Gly
 50 55 60
 Gly Pro Ser Gly Gly Ser Pro Gly Gly Ala Ala Ser Gly Ala Gly Pro
 65 70 75 80
 Gly Thr Gln Gln Gly Ser Pro Gly Trp Ser Gln Ala Gly Ala Thr Gly
 85 90 95
 Ala Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Val Ser Pro Arg Phe Ser Phe Pro Gly
 100 105 110
 Thr Thr Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Glu
 115 120 125
 Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala

130		135		140
Gly Arg Glu Gln Tyr	Gly Arg Ala Gly Phe Ala	Gly Ser Tyr Ser Ser		
145	150	155	160	
Pro Tyr Pro Ala Tyr	Met Ala Asp Val Gly Ala Ser Trp	Ala Ala Ala		
165	170	175		
Ala Ala Ala Ser Ala	Gly Pro Phe Asp Ser Pro Val	Leu His Ser Leu		
180	185	190		
Pro Gly Arg Ala Asn	Pro Ala Ala Arg His Pro Asn	Leu Asp Met Phe		
195	200	205		
Asp Asp Phe Ser Glu	Gly Arg Glu Cys Val Asn Cys	Gly Ala Met Ser		
210	215	220		
Thr Pro Leu Trp Arg	Arg Asp Gly Thr Gly His Tyr	Leu Cys Asn Ala		
225	230	235	240	
Cys Gly Leu Tyr His	Lys Met Asn Gly Ile Asn Arg	Pro Leu Ile Lys		
245	250	255		
Pro Gln Arg Arg Leu	Ser Ala Ser Arg Arg Val Gly	Leu Ser Cys Ala		
260	265	270		
Asn Cys Gln Thr Thr	Thr Thr Thr Leu Trp Arg Arg	Asn Ala Glu Gly		
275	280	285		
Glu Pro Val Cys Asn	Ala Cys Gly Leu Tyr Met Lys	Leu His Gly Val		
290	295	300		
Pro Arg Pro Leu Ala	Met Arg Lys Glu Gly Ile Gln	Thr Arg Lys Arg		
305	310	315	320	
Lys Pro Lys Asn Leu	Asn Lys Ser Lys Thr Pro Ala	Ala Pro Ser Gly		
325	330	335		
Ser Glu Ser Leu Pro	Pro Ala Ser Gly Ala Ser Ser	Asn Ser Ser Asn		
340	345	350		
Ala Thr Thr Ser Ser	Ser Glu Glu Met Arg Pro Ile	Lys Thr Glu Pro		
355	360	365		
Gly Leu Ser Ser His	Tyr Gly His Ser Ser Ser	Val Ser Gln Thr Phe		
370	375	380		
Ser Val Ser Ala Met	Ser Gly His Gly Pro Ser Ile	His Pro Val Leu		
385	390	395	400	
Ser Ala Leu Lys Leu	Ser Pro Gln Gly Tyr Ala Ser	Pro Val Ser Gln		
405	410	415		
Ser Pro Gln Thr Ser	Ser Lys Gln Asp Ser Trp	Asn Ser Leu Val Leu		

420 425 430
 Ala Asp Ser His Gly Asp Ile Ile Thr Ala
 435 440
 <210> 12
 <211> 1326
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <223> (1)..(1329)
 <400> 12
 atg tat cag agc ttg gcc atg gcc gcc aac cac ggg ccg ccc ccc ggt 48
 Met Tyr Gln Ser Leu Ala Met Ala Ala Asn His Gly Pro Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 gcc tac cag gcg ggc ggc ccc ggc ccc ttc atg cac ggc gcg ggc gcc 96
 Ala Tyr Gln Ala Gly Gly Pro Gly Pro Phe Met His Gly Ala Gly Ala
 20 25 30
 gcg tcc tcg cca gtc tac ctg ccc aca ccg cgg gtg ccc tcc tcc gtt 144
 Ala Ser Ser Pro Val Tyr Leu Pro Thr Pro Arg Val Pro Ser Ser Val
 35 40 45
 ctg ggc ctg tcc tac ctc cag ggc gga ggc gcg ggc tct gcg tcc gga 192
 Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ser Gly
 50 55 60
 ggc ccc tcg ggc ggc agc ccc ggt ggg gcc gcg tct ggt gcg ggg ccc 240
 Gly Pro Ser Gly Gly Ser Pro Gly Gly Ala Ala Ser Gly Ala Gly Pro
 65 70 75 80
 ggg acc cag cag ggc agc ccg gga tgg agc cag gcg gga gcg acc gga 288
 Gly Thr Gln Gln Gly Ser Pro Gly Trp Ser Gln Ala Gly Ala Thr Gly
 85 90 95
 gcc gct tac acc ccg ccg ccg gtg tcg ccg cgc ttc tcc ttc ccg ggg 336
 Ala Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Val Ser Pro Arg Phe Ser Phe Pro Gly
 100 105 110
 acc acc ggg tcc ctg gcg gcg gcg gcg gcg gct gcc gcc gcc cgg gaa 384
 Thr Thr Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Glu
 115 120 125
 gct gcg gcc tac agc agt ggc ggc gga gcg gcg ggt gcg ggc ctg gcg 432

Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala	
130	135
ggc cgc gag cag tac ggg cgc gcc ggc ttc gcg ggc tcc tac tcc agc	480
Gly Arg Glu Gln Tyr Gly Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ser Tyr Ser Ser	
145	150
ccc tac ccg gct tac atg gcc gac gtg ggc gcg tcc tgg gcc gca gcc	528
Pro Tyr Pro Ala Tyr Met Ala Asp Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Ala	
165	170
gcc gcc gcc tcc gcc ggc ccc ttc gac agc ccg gtc ctg cac agc ctg	576
Ala Ala Ala Ser Ala Gly Pro Phe Asp Ser Pro Val Leu His Ser Leu	
180	185
ccc ggc cgg gcc aac ccg gcc gcc cga cac ccc aat ctc gat atg ttt	624
Pro Gly Arg Ala Asn Pro Ala Ala Arg His Pro Asn Leu Asp Met Phe	
195	200
gac gac ttc tca gaa ggc aga gag tgt gtc aac tgt ggg gct atg tcc	672
Asp Asp Phe Ser Glu Gly Arg Glu Cys Val Asn Cys Gly Ala Met Ser	
210	215
acc ccg ctc tgg agg cga gat ggg acg ggt cac tat ctg tgc aac gcc	720
Thr Pro Leu Trp Arg Arg Asp Gly Thr Gly His Tyr Leu Cys Asn Ala	
225	230
tgt ggc ctc tac cac aag atg aac ggc atc aac cgg ccg ctc atc aag	768
Cys Gly Leu Tyr His Lys Met Asn Gly Ile Asn Arg Pro Leu Ile Lys	
245	250
cct cag cgc cgg ctg tcc gcc tcc cgc cga gtg ggc ctc tcc tgt gcc	816
Pro Gln Arg Arg Leu Ser Ala Ser Arg Arg Val Gly Leu Ser Cys Ala	
260	265
aac tgc cag acc acc acc acc acc acg ctg tgg cgc cgc aat gcg gag ggc	864
Asn Cys Gln Thr Thr Thr Thr Thr Leu Trp Arg Arg Asn Ala Glu Gly	
275	280
gag cct gtg tgc aat gcc tgc ggc ctc tac atg aag ctc cac ggg gtg	912
Glu Pro Val Cys Asn Ala Cys Gly Leu Tyr Met Lys Leu His Gly Val	
290	295
ccc agg cct ctt gca atg cgg aaa gag ggg atc caa acc aga aaa cgg	960
Pro Arg Pro Leu Ala Met Arg Lys Glu Gly Ile Gln Thr Arg Lys Arg	
305	310
aag ccc aag aac ctg aat aaa tct aag aca cca gca gct cct tca ggc	1008

Lys Pro Lys Asn Leu Asn Lys Ser Lys Thr Pro Ala Ala Pro Ser Gly
 325 330 335
 agt gag agc ctt cct ccc gcc agc ggt gct tcc agc aac tcc agc aac 1056
 Ser Glu Ser Leu Pro Pro Ala Ser Gly Ala Ser Ser Asn Ser Ser Asn
 340 345 350
 gcc acc acc agc agc agc gag gag atg cgt ccc atc aag acg gag cct 1104
 Ala Thr Thr Ser Ser Ser Glu Glu Met Arg Pro Ile Lys Thr Glu Pro
 355 360 365
 ggc ctg tca tct cac tac ggg cac agc agc tcc gtg tcc cag acg ttc 1152
 Gly Leu Ser Ser His Tyr Gly His Ser Ser Ser Val Ser Gln Thr Phe
 370 375 380
 tca gtc agt gcg atg tct ggc cat ggg ccc tcc atc cac cct gtc ctc 1200
 Ser Val Ser Ala Met Ser Gly His Gly Pro Ser Ile His Pro Val Leu
 385 390 395 400
 tcg gcc ctg aag ctc tcc cca caa ggc tat gcg tct ccc gtc agc cag 1248
 Ser Ala Leu Lys Leu Ser Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Pro Val Ser Gln
 405 410 415
 tct cca cag acc agc tcc aag cag gac tct tgg aac agt ctg gtc ttg 1296
 Ser Pro Gln Thr Ser Ser Lys Gln Asp Ser Trp Asn Ser Leu Val Leu
 420 425 430
 gcc gac agt cac ggg gac ata atc act gcg 1326
 Ala Asp Ser His Gly Asp Ile Ile Thr Ala
 435 440

<210> 13

<211> 507

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn
 1 5 10 15
 Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala
 20 25 30
 Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe
 35 40 45
 Asn Ser Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys
 50 55 60

Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Asn	Glu	Pro	His	Glu	Ser	Arg	Thr	65	70	75	80
Asn	Ser	Asp	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Glu	His	Arg	Gly	Cys	85	90	95	
Asp	Ser	Pro	Asp	Pro	Asp	Thr	Ser	Tyr	Val	Leu	Thr	Pro	His	Thr	Glu	100	105	110	
Glu	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ile	Asn	Glu	Glu	Phe	Asp	Asn	Met	Met	Arg	Asn	115	120	125	
His	Lys	Ile	Ala	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Gln	Asn	Phe	Ser	Met	Ser	Val	130	135	140	
Thr	Val	Pro	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ala	Leu	Ser	Tyr	Thr	Asn	Pro	Gly	145	150	155	160
Ser	Ser	Leu	Val	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp	165	170	175	
Ser	Ser	Met	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Thr	Thr	Leu	His	Arg	Asn	Val	Ser	180	185	190	
Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Arg	Pro	Pro	Ser	Thr	Gly	Asn	Ala	Gly	Gly	Met	195	200	205	
Leu	Ser	Thr	Thr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Asn	Gly	Ala	Gly	Ser	Ser	Pro	210	215	220	
Val	Gly	Asn	Gly	Phe	Val	Asn	Ser	Arg	Ala	Ser	Pro	Asn	Leu	Ile	Gly	225	230	235	240
Ala	Thr	Gly	Ala	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys	Val	Met	Pro	Thr	Lys	Ser	Pro	245	250	255	
Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Ser	Arg	Lys	Pro	Asp	260	265	270	
Leu	Arg	Val	Val	Ile	Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Gly	Met	Met	Pro	Pro	Leu	275	280	285	
Ser	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Asn	Thr	Gln	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	290	295	300	
Gln	Ala	Thr	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Pro	Val	Val	Ser	Val	Thr	Thr	Pro	305	310	315	320
Ser	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Leu	Val	Tyr	Ser	Ala	Met	Pro	Thr	Ala	Tyr	325	330	335	
Asn	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ser	Ala	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Gly	340	345	350	

Phe Asn Ser Pro Gly Met Leu Ser Leu Gly Gln Val Ser Ala Trp Gln
 355 360 365
 Gln His His Leu Gly Gln Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Ala Gly Gly
 370 375 380
 Gln Leu Ser Gln Gly Ser Asn Leu Ser Ile Asn Thr Asn Gln Asn Ile
 385 390 395 400
 Ser Ile Lys Ser Glu Pro Ile Ser Pro Pro Arg Asp Arg Met Thr Pro
 405 410 415
 Ser Gly Phe Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro
 420 425 430
 Pro Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Arg Gln
 435 440 445
 Glu Met Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 450 455 460
 Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp Pro Arg Gly Asp Phe His Ser Pro
 465 470 475 480
 Ile Val Leu Gly Arg Pro Pro Asn Thr Glu Asp Arg Glu Ser Pro Ser
 485 490 495
 Val Lys Arg Met Arg Met Asp Ala Trp Val Thr
 500 505

<210> 14

<211> 1521

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1524)

<400> 14

atg ggg cgg aag aaa ata caa atc aca cgc ata atg gat gaa agg aac 48
 Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn
 1 5 10 15
 cga cag gtc act ttt aca aag aga aag ttt gga tta atg aag aaa gcc 96
 Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala
 20 25 30
 tat gaa ctt agt gtg ctc tgt gac tgt gaa ata gca ctc atc att ttc 144
 Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe

35	40	45	
aac agc tct aac aaa ctg ttt caa tat gct agc act gat atg gac aaa	192		
Asn Ser Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys			
50	55	60	
gtt ctt ctc aag tat aca gaa tat aat gaa cct cat gaa agc aga acc	240		
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65	70	75	80
aac tcg gat att gtt gag gct ctg aac aag aag gaa cac aga ggg tgc	288		
Asn Ser Asp Ile Val Glu Ala Leu Asn Lys Lys Glu His Arg Gly Cys			
85	90	95	
gac agc cca gac cct gat act tca tat gtg cta act cca cat aca gaa	336		
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Thr Ser Tyr Val Leu Thr Pro His Thr Glu			
100	105	110	
gaa aaa tat aaa aaa att aat gag gaa ttt gat aat atg atg cgg aat	384		
Glu Lys Tyr Lys Lys Ile Asn Glu Glu Phe Asp Asn Met Met Arg Asn			
115	120	125	
cat aaa atc gca cct ggt ctg cca cct cag aac ttt tca atg tct gtc	432		
His Lys Ile Ala Pro Gly Leu Pro Pro Gln Asn Phe Ser Met Ser Val			
130	135	140	
aca gtt cca gtg acc agc ccc aat gct ttg tcc tac act aac cca ggg	480		
Thr Val Pro Val Thr Ser Pro Asn Ala Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Gly			
145	150	155	160
agt tca ctg gtg tcc cca tct ttg gca gcc agc tca acg tta aca gat	528		
Ser Ser Leu Val Ser Pro Ser Leu Ala Ala Ser Ser Thr Leu Thr Asp			
165	170	175	
tca agc atg ctc tct cca cct caa acc aca tta cat aga aat gtg tct	576		
Ser Ser Met Leu Ser Pro Pro Gln Thr Thr Leu His Arg Asn Val Ser			
180	185	190	
cct gga gct cct cag aga cca cca agt act ggc aat gca ggt ggg atg	624		
Pro Gly Ala Pro Gln Arg Pro Pro Ser Thr Gly Asn Ala Gly Gly Met			
195	200	205	
ttg agc act aca gac ctc aca gtg cca aat gga gct gga agc agt cca	672		
Leu Ser Thr Thr Asp Leu Thr Val Pro Asn Gly Ala Gly Ser Ser Pro			
210	215	220	
gtg ggg aat gga ttt gta aac tca aga gct tct cca aat ttg att gga	720		
Val Gly Asn Gly Phe Val Asn Ser Arg Ala Ser Pro Asn Leu Ile Gly			

225	230	235	240	
gct act ggt gca aat agc tta ggc aaa gtc atg cct aca aag tct ccc	768			
Ala Thr Gly Ala Asn Ser Leu Gly Lys Val Met Pro Thr Lys Ser Pro				
245	250	255		
cct cca cca ggt ggt ggt aat ctt gga atg aac agt agg aaa cca gat	816			
Pro Pro Pro Gly Gly Gly Asn Leu Gly Met Asn Ser Arg Lys Pro Asp				
260	265	270		
ctt cga gtt gtc atc ccc cct tca agc aag ggc atg atg cct cca cta	864			
Leu Arg Val Val Ile Pro Pro Ser Ser Lys Gly Met Met Pro Pro Leu				
275	280	285		
tcg gag gaa gag gaa ttg gag ttg aac acc caa agg atc agt agt tct	912			
Ser Glu Glu Glu Glu Leu Glu Leu Asn Thr Gln Arg Ile Ser Ser Ser				
290	295	300		
caa gcc act caa cct ctt gct acc cca gtc gtg tct gtg aca acc cca	960			
Gln Ala Thr Gln Pro Leu Ala Thr Pro Val Val Ser Val Thr Thr Pro				
305	310	315	320	
agc ttg cct ccg caa gga ctt gtg tac tca gca atg ccg act gcc tac	1008			
Ser Leu Pro Pro Gln Gly Leu Val Tyr Ser Ala Met Pro Thr Ala Tyr				
325	330	335		
aac act gat tat tca ctg acc agc gct gac ctg tca gcc ctt caa ggc	1056			
Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ser Ala Asp Leu Ser Ala Leu Gln Gly				
340	345	350		
ttc aac tcg cca gga atg ctg tcg ctg gga cag gtg tcg gcc tgg cag	1104			
Phe Asn Ser Pro Gly Met Leu Ser Leu Gly Gln Val Ser Ala Trp Gln				
355	360	365		
cag cac cac cta gga caa gca gcc ctc agc tct ctt gtt gct gga ggg	1152			
Gln His His Leu Gly Gln Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Ala Gly Gly				
370	375	380		
cag tta tct cag ggt tcc aat tta tcc att aat acc aac caa aac atc	1200			
Gln Leu Ser Gln Gly Ser Asn Leu Ser Ile Asn Thr Asn Gln Asn Ile				
385	390	395	400	
agc atc aag tcc gaa ccg att tca cct cct cgg gat cgt atg acc cca	1248			
Ser Ile Lys Ser Glu Pro Ile Ser Pro Pro Arg Asp Arg Met Thr Pro				
405	410	415		
tcg ggc ttc cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag ccg ccg	1296			
Ser Gly Phe Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro				

420 425 430
 cca cca ccg cag ccc cag cca caa ccc ccg cag ccc cag ccc cga cag 1344
 Pro Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Arg Gln
 435 440 445
 gaa atg ggg cgc tcc cct gtg gac agt ctg agc agc tct agt agc tcc 1392
 Glu Met Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 450 455 460
 tat gat ggc agt gat cgg gag gat cca cgg ggc gac ttc cat tct cca 1440
 Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp Pro Arg Gly Asp Phe His Ser Pro
 465 470 475 480
 att gtg ctt ggc cga ccc cca aac act gag gac aga gaa agc cct tct 1488
 Ile Val Leu Gly Arg Pro Pro Asn Thr Glu Asp Arg Glu Ser Pro Ser
 485 490 495
 gta aag cga atg agg atg gac gcg tgg gtg acc 1521
 Val Lys Arg Met Arg Met Asp Ala Trp Val Thr
 500 505
 <210> 15
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Ser Arg Ile Leu Asp Gln Arg Asn
 1 5 10 15
 Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala
 20 25 30
 Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe
 35 40 45
 Asn Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Arg
 50 55 60
 Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Ser Glu Pro His Glu Ser Arg Thr
 65 70 75 80
 Asn Thr Asp Ile Leu Glu Thr Leu Lys Arg Arg Gly Ile Gly Leu Asp
 85 90 95
 Gly Pro Glu Leu Glu Pro Asp Glu Gly Pro Glu Glu Pro Gly Glu Lys
 100 105 110
 Phe Arg Arg Leu Ala Gly Glu Gly Gly Asp Pro Ala Leu Pro Arg Pro

115	120	125
Arg Leu Tyr Pro Ala Ala Pro Ala Met Pro Ser Pro Asp Val Val Tyr		
130	135	140
Gly Ala Leu Pro Pro Pro Gly Cys Asp Pro Ser Gly Leu Gly Glu Ala		
145	150	155
Leu Pro Ala Gln Ser Arg Pro Ser Pro Phe Arg Pro Ala Ala Pro Lys		
165	170	175
Ala Gly Pro Pro Gly Leu Val His Pro Leu Phe Ser Pro Ser His Leu		
180	185	190
Thr Ser Lys Thr Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Pro Thr Glu Gly Arg Arg		
195	200	205
Ser Asp Leu Pro Gly Gly Leu Ala Gly Pro Arg Gly Gly Leu Asn Thr		
210	215	220
Ser Arg Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Gln Asn Pro Cys Ser Thr Ala Thr		
225	230	235
Pro Gly Pro Pro Leu Gly Ser Phe Pro Phe Leu Pro Gly Gly Pro Pro		
245	250	255
Val Gly Ala Glu Ala Trp Ala Arg Arg Val Pro Gln Pro Ala Ala Pro		
260	265	270
Pro Arg Arg Pro Pro Gln Ser Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg		
275	280	285
Pro Pro Gly Ala Pro Ala Thr Phe Leu Arg Pro Ser Pro Ile Pro Cys		
290	295	300
Ser Ser Pro Gly Pro Trp Gln Ser Leu Cys Gly Leu Gly Pro Pro Cys		
305	310	315
Ala Gly Cys Pro Trp Pro Thr Ala Gly Pro Gly Arg Arg Ser Pro Gly		
325	330	335
Gly Thr Ser Pro Glu Arg Ser Pro Gly Thr Ala Arg Ala Arg Gly Asp		
340	345	350
Pro Thr Ser Leu Gln Ala Ser Ser Glu Lys Thr Gln Gln		
355	360	

<210> 16

<211> 1095

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1098)

<400> 16

```

atg ggg agg aaa aaa atc cag atc tcc cgc atc ctg gac caa agg aat      48
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Ser Arg Ile Leu Asp Gln Arg Asn
   1             5             10             15
cgg cag gtg acg ttc acc aag cgg aag ttc ggg ctg atg aag aag gcc      96
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala
           20             25             30
tat gag ctg agc gtg ctc tgt gac tgt gag ata gcc ctc atc atc ttc     144
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe
       35             40             45
aac agc gcc aac cgc ctc ttc cag tat gcc agc acg gac atg gac cgt     192
Asn Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Arg
       50             55             60
gtg ctg ctg aag tac aca gag tac agc gag ccc cac gag agc cgc acc     240
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Ser Glu Pro His Glu Ser Arg Thr
       65             70             75             80
aac act gac atc ctc gag acg ctg aag cgg agg ggc att ggc ctc gat     288
Asn Thr Asp Ile Leu Glu Thr Leu Lys Arg Arg Gly Ile Gly Leu Asp
           85             90             95
ggg cca gag ctg gag ccg gat gaa ggg cct gag gag cca gga gag aag     336
Gly Pro Glu Leu Glu Pro Asp Glu Gly Pro Glu Glu Pro Gly Glu Lys
       100             105             110
ttt cgg agg ctg gca ggc gaa ggg ggt gat ccg gcc ttg ccc cga ccc     384
Phe Arg Arg Leu Ala Gly Glu Gly Gly Asp Pro Ala Leu Pro Arg Pro
       115             120             125
cgg ctg tat cct gca gct cct gct atg ccc agc cca gat gtg gta tac     432
Arg Leu Tyr Pro Ala Ala Pro Ala Met Pro Ser Pro Asp Val Val Tyr
       130             135             140
ggg gcc tta ccg cca cca ggc tgt gac ccc agt ggg ctt ggg gaa gca     480
Gly Ala Leu Pro Pro Pro Gly Cys Asp Pro Ser Gly Leu Gly Glu Ala
       145             150             155             160
ctg ccc gcc cag agc cgc cca tct ccc ttc cga cca gca gcc ccc aaa     528
Leu Pro Ala Gln Ser Arg Pro Ser Pro Phe Arg Pro Ala Ala Pro Lys
           165             170             175

```

```

gcc ggg ccc cca ggc ctg gtg cac cct ctc ttc tca cca agc cac ctc 576
Ala Gly Pro Pro Gly Leu Val His Pro Leu Phe Ser Pro Ser His Leu
      180              185              190
acc agc aag aca cca ccc cca ctg tac ctg ccg acg gaa ggg cgg agg 624
Thr Ser Lys Thr Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Pro Thr Glu Gly Arg Arg
      195              200              205
tca gac ctg cct ggt ggc ctg gct ggg ccc cga ggg gga cta aac acc 672
Ser Asp Leu Pro Gly Gly Leu Ala Gly Pro Arg Gly Gly Leu Asn Thr
      210              215              220
tcc aga agc ctc tac agt ggc ctg cag aac ccc tgc tcc act gca act 720
Ser Arg Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Gln Asn Pro Cys Ser Thr Ala Thr
225              230              235              240
ccc gga ccc cca ctg ggg agc ttc ccc ttc ctc ccc gga ggc ccc cca 768
Pro Gly Pro Pro Leu Gly Ser Phe Pro Phe Leu Pro Gly Gly Pro Pro
      245              250              255
gtg ggg gcc gaa gcc tgg gcg agg agg gtc ccc caa ccc gcg gcg cct 816
Val Gly Ala Glu Ala Trp Ala Arg Arg Val Pro Gln Pro Ala Ala Pro
      260              265              270
ccc cgc cga ccc ccc cag tca gca tca agt ctg agc gcc tct ctc cgg 864
Pro Arg Arg Pro Pro Gln Ser Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg
      275              280              285
ccc ccg ggg gcc ccg gcg act ttc cta aga cct tcc cct atc cct tgc 912
Pro Pro Gly Ala Pro Ala Thr Phe Leu Arg Pro Ser Pro Ile Pro Cys
      290              295              300
tcc tcg ccc ggt ccc tgg cag agc ctc tgc ggc ctg ggc ccg ccc tgc 960
Ser Ser Pro Gly Pro Trp Gln Ser Leu Cys Gly Leu Gly Pro Pro Cys
305              310              315              320
gcc ggc tgc cct tgg ccg acg gct ggc ccc ggt agg aga tca ccc ggt 1008
Ala Gly Cys Pro Trp Pro Thr Ala Gly Pro Gly Arg Arg Ser Pro Gly
      325              330              335
ggc acc agc cca gag cgc tcg cca ggt acg gcg agg gca cgt ggg gac 1056
Gly Thr Ser Pro Glu Arg Ser Pro Gly Thr Ala Arg Ala Arg Gly Asp
      340              345              350
ccc acc tcc ctc cag gcc tct tca gag aag acc caa cag 1095
Pro Thr Ser Leu Gln Ala Ser Ser Glu Lys Thr Gln Gln
      355              360              365

```

<210> 17

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn
  1           5           10           15
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala
          20           25           30
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe
          35           40           45
Asn Ser Thr Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys
          50           55           60
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr
          65           70           75           80
Asn Ser Asp Ile Val Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Leu Asn Gly Cys
          85           90           95
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Ala Asp Asp Ser Val Gly His Ser Pro Glu
          100          105          110
Ser Glu Asp Lys Tyr Arg Lys Ile Asn Glu Asp Ile Asp Leu Met Ile
          115          120          125
Ser Arg Gln Arg Leu Cys Ala Val Pro Pro Pro Asn Phe Glu Met Pro
          130          135          140
Val Ser Ile Pro Val Ser Ser His Asn Ser Leu Val Tyr Ser Asn Pro
          145          150          155          160
Val Ser Ser Leu Gly Asn Pro Asn Leu Leu Pro Leu Ala His Pro Ser
          165          170          175
Leu Gln Arg Asn Ser Met Ser Pro Gly Val Thr His Arg Pro Pro Ser
          180          185          190
Ala Gly Asn Thr Gly Gly Leu Met Gly Gly Asp Leu Thr Ser Gly Ala
          195          200          205
Gly Thr Ser Ala Gly Asn Gly Tyr Gly Asn Pro Arg Asn Ser Pro Gly
          210          215          220
Leu Leu Val Ser Pro Gly Asn Leu Asn Lys Asn Met Gln Ala Lys Ser
          225          230          235          240
Pro Pro Pro Met Asn Leu Gly Met Asn Asn Arg Lys Pro Asp Leu Arg

```


atg ggg aga aaa aag att cag att acg agg att atg gat gaa cgt aac	48
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn	
1 5 10 15	
aga cag gtg aca ttt aca aag agg aaa ttt ggg ttg atg aag aag gct	96
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala	
20 25 30	
tat gag ctg agc gtg ctg tgt gac tgt gag att gcg ctg atc atc ttc	144
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe	
35 40 45	
aac agc acc aac aag ctg ttc cag tat gcc agc acc gac atg gac aaa	192
Asn Ser Thr Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys	
50 55 60	
gtg ctt ctc aag tac acg gag tac aac gag ccg cat gag agc cgg aca	240
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr	
65 70 75 80	
aac tca gac atc gtg gag acg ttg aga aag aag ggc ctt aat ggc tgt	288
Asn Ser Asp Ile Val Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Leu Asn Gly Cys	
85 90 95	
gac agc cca gac ccc gat gcg gac gat tcc gta ggt cac agc cct gag	336
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Ala Asp Asp Ser Val Gly His Ser Pro Glu	
100 105 110	
tct gag gac aag tac agg aaa att aac gaa gat att gat cta atg atc	384
Ser Glu Asp Lys Tyr Arg Lys Ile Asn Glu Asp Ile Asp Leu Met Ile	
115 120 125	
agc agg caa aga ttg tgt gct gtt cca cct ccc aac ttc gag atg cca	432
Ser Arg Gln Arg Leu Cys Ala Val Pro Pro Pro Asn Phe Glu Met Pro	
130 135 140	
gtc tcc atc cca gtg tcc agc cac aac agt ttg gtg tac agc aac cct	480
Val Ser Ile Pro Val Ser Ser His Asn Ser Leu Val Tyr Ser Asn Pro	
145 150 155 160	
gtc agc tca ctg gga aac ccc aac cta ttg cca ctg gct cac cct tct	528
Val Ser Ser Leu Gly Asn Pro Asn Leu Leu Pro Leu Ala His Pro Ser	
165 170 175	
ctg cag agg aat agt atg tct cct ggt gta aca cat cga cct cca agt	576
Leu Gln Arg Asn Ser Met Ser Pro Gly Val Thr His Arg Pro Pro Ser	
180 185 190	

gca ggt aac aca ggt ggt ctg atg ggt gga gac ctc acg tct ggt gca	624
Ala Gly Asn Thr Gly Gly Leu Met Gly Gly Asp Leu Thr Ser Gly Ala	
195 200 205	
ggc acc agt gca ggg aac ggg tat ggc aat ccc cga aac tca cca ggt	672
Gly Thr Ser Ala Gly Asn Gly Tyr Gly Asn Pro Arg Asn Ser Pro Gly	
210 215 220	
ctg ctg gtc tca cct ggt aac ttg aac aag aat atg caa gca aaa tct	720
Leu Leu Val Ser Pro Gly Asn Leu Asn Lys Asn Met Gln Ala Lys Ser	
225 230 235 240	
cct ccc cca atg aat tta gga atg aat aac cgt aaa cca gat ctc cga	768
Pro Pro Pro Met Asn Leu Gly Met Asn Asn Arg Lys Pro Asp Leu Arg	
245 250 255	
gtt ctt att cca cca ggc agc aag aat acg atg cca tca gtg aat caa	816
Val Leu Ile Pro Pro Gly Ser Lys Asn Thr Met Pro Ser Val Asn Gln	
260 265 270	
agg ata aat aac tcc cag tcg gct cag tca ttg gct acc cca gtg gtt	864
Arg Ile Asn Asn Ser Gln Ser Ala Gln Ser Leu Ala Thr Pro Val Val	
275 280 285	
tcc gta gca act cct act tta cca gga caa gga atg gga gga tat cca	912
Ser Val Ala Thr Pro Thr Leu Pro Gly Gln Gly Met Gly Gly Tyr Pro	
290 295 300	
tca gcc att tca aca aca tat ggt acc gag tac tct ctg agt agt gca	960
Ser Ala Ile Ser Thr Thr Tyr Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Ser Ser Ala	
305 310 315 320	
gac ctg tca tct ctg tct ggg ttt aac acc gcc agc gct ctt cac ctt	1008
Asp Leu Ser Ser Leu Ser Gly Phe Asn Thr Ala Ser Ala Leu His Leu	
325 330 335	
ggt tca gta act ggc tgg caa cag caa cac cta cat aac atg cca cca	1056
Gly Ser Val Thr Gly Trp Gln Gln Gln His Leu His Asn Met Pro Pro	
340 345 350	
tct gcc ctc agt cag ttg gga gct tgc act agc act cat tta tct cag	1104
Ser Ala Leu Ser Gln Leu Gly Ala Cys Thr Ser Thr His Leu Ser Gln	
355 360 365	
agt tca aat ctc tcc ctg cct tct act caa agc ctc aac atc aag tca	1152
Ser Ser Asn Leu Ser Leu Pro Ser Thr Gln Ser Leu Asn Ile Lys Ser	
370 375 380	

gaa cct gtt tct cct cct aga gac cgt acc acc acc cct tcg aga tac 1200
 Glu Pro Val Ser Pro Pro Arg Asp Arg Thr Thr Thr Pro Ser Arg Tyr
 385 390 395 400
 cca caa cac acg cgc cac gag gcg ggg aga tct cct gtt gac agc ttg 1248
 Pro Gln His Thr Arg His Glu Ala Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu
 405 410 415
 agc agc tgt agc agt tcg tac gac ggg agc gac cga gag gat cac cgg 1296
 Ser Ser Cys Ser Ser Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp His Arg
 420 425 430
 aac gaa ttc cac tcc ccc att gga ctc acc aga cct tcg ccg gac gaa 1344
 Asn Glu Phe His Ser Pro Ile Gly Leu Thr Arg Pro Ser Pro Asp Glu
 435 440 445
 agg gaa agt ccc tca gtc aag cgc atg cga ctt tct gaa gga tgg gca 1392
 Arg Glu Ser Pro Ser Val Lys Arg Met Arg Leu Ser Glu Gly Trp Ala
 450 455 460
 aca 1395
 Thr
 465
 <210> 19
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Asn
 1 5 10 15
 Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala
 20 25 30
 Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe
 35 40 45
 Asn His Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys
 50 55 60
 Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr
 65 70 75 80
 Asn Ala Asp Ile Ile Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Phe Asn Gly Cys
 85 90 95
 Asp Ser Pro Glu Pro Asp Gly Glu Asp Ser Leu Glu Gln Ser Pro Leu

385 390 395 400
 Pro Gln Gln Gln Ser His Leu Val Pro Val Ser Leu Ser Asn Leu Ile
 405 410 415
 Pro Gly Ser Pro Leu Pro His Val Gly Ala Ala Leu Thr Val Thr Thr
 420 425 430
 His Pro His Ile Ser Ile Lys Ser Glu Pro Val Ser Pro Ser Arg Glu
 435 440 445
 Arg Ser Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Val Phe Pro Ala Ala Arg Pro
 450 455 460
 Glu Pro Gly Asp Gly Leu Ser Ser Pro Ala Gly Gly Ser Tyr Glu Thr
 465 470 475 480
 Gly Asp Arg Asp Asp Gly Arg Gly Asp Phe Gly Pro Thr Leu Gly Leu
 485 490 495
 Leu Arg Pro Ala Pro Glu Pro Glu Ala Glu Gly Ser Ala Val Lys Arg
 500 505 510
 Met Arg Leu Asp Thr Trp Thr Leu Lys
 515 520

<210> 20

<211> 1563

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1566)

<400> 20

atg ggg agg aaa aag att cag atc cag cga atc acc gac gag cgg aac 48
 Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Asn
 1 5 10 15
 cga cag gtg act ttc acc aag cgg aag ttt ggc ctg atg aag aag gcg 96
 Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala
 20 25 30
 tat gag ctg agc gtg cta tgt gac tgc gag atc gca ctc atc atc ttc 144
 Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe
 35 40 45
 aac cac tcc aac aag ctg ttc cag tac gcc agc acc gac atg gac aag 192
 Asn His Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys

50	55	60	
gtg ctg ctc aag tac acg gag tac aat gag cca cac gag agc cgc acc	240		
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65	70	75	80
aac gcc gac atc atc gag acc ctg agg aag aag ggc ttc aat ggc tgc	288		
Asn Ala Asp Ile Ile Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Phe Asn Gly Cys			
85	90	95	
gac agc ccc gag ccc gac ggg gag gac tcg ctg gaa cag agc ccc ctg	336		
Asp Ser Pro Glu Pro Asp Gly Glu Asp Ser Leu Glu Gln Ser Pro Leu			
100	105	110	
ctg gag gac aag tac cga cgc gcc agc gag gag ctc gac ggg ctc ttc	384		
Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Arg Ala Ser Glu Glu Leu Asp Gly Leu Phe			
115	120	125	
cgg cgc tat ggg tca act gtc ccg gcc ccc aac ttt gcc atg cct gtc	432		
Arg Arg Tyr Gly Ser Thr Val Pro Ala Pro Asn Phe Ala Met Pro Val			
130	135	140	
acg gtg ccc gtg tcc aat cag agc tca ctg cag ttc agc aat ccc agc	480		
Thr Val Pro Val Ser Asn Gln Ser Ser Leu Gln Phe Ser Asn Pro Ser			
145	150	155	160
ggc tcc ctg gtc acc cct tcc ctg gtg aca tca tcc ctc acg gac ccg	528		
Gly Ser Leu Val Thr Pro Ser Leu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asp Pro			
165	170	175	
cgg ctc ctg tcc ccc cag cag cca gca cta cag agg aac agt gtg tct	576		
Arg Leu Leu Ser Pro Gln Gln Pro Ala Leu Gln Arg Asn Ser Val Ser			
180	185	190	
cct ggc ctg ccc cag cgg cca gct agt gcg ggg gcc atg ctg ggg ggt	624		
Pro Gly Leu Pro Gln Arg Pro Ala Ser Ala Gly Ala Met Leu Gly Gly			
195	200	205	
gac ctg aac agt gct aac gga gcc tgc ccc agc cct gtt ggg aat ggc	672		
Asp Leu Asn Ser Ala Asn Gly Ala Cys Pro Ser Pro Val Gly Asn Gly			
210	215	220	
tac gtc agt gct cgg gct tcc cct ggc ctc ctc cct gtg gcc aat ggc	720		
Tyr Val Ser Ala Arg Ala Ser Pro Gly Leu Leu Pro Val Ala Asn Gly			
225	230	235	240
aac agc cta aac aag gtc atc cct gcc aag tct ccg ccc cca cct acc	768		
Asn Ser Leu Asn Lys Val Ile Pro Ala Lys Ser Pro Pro Pro Pro Thr			

	245		250		255	
cac agc acc cag ctt gga gcc ccc agc cgc aag ccc gac ctg cga gtc						816
His Ser Thr Gln Leu Gly Ala Pro Ser Arg Lys Pro Asp Leu Arg Val						
	260		265		270	
atc act tcc cag gca gga aag ggg tta atg cat cac ttg act gag gac						864
Ile Thr Ser Gln Ala Gly Lys Gly Leu Met His His Leu Thr Glu Asp						
	275		280		285	
cat tta gat ctg aac aat gcc cag cgc ctt ggg gtc tcc cag tct act						912
His Leu Asp Leu Asn Asn Ala Gln Arg Leu Gly Val Ser Gln Ser Thr						
	290		295		300	
cat tcg ctc acc acc cca gtg gtt tct gtg gca acg ccg agt tta ctc						960
His Ser Leu Thr Thr Pro Val Val Ser Val Ala Thr Pro Ser Leu Leu						
305		310		315		320
agc cag ggc ctc ccc ttc tct tcc atg ccc act gcc tac aac aca gat						1008
Ser Gln Gly Leu Pro Phe Ser Ser Met Pro Thr Ala Tyr Asn Thr Asp						
	325		330		335	
tac cag ttg acc agt gca gag ctc tcc tcc tta cca gcc ttt agt tca						1056
Tyr Gln Leu Thr Ser Ala Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ala Phe Ser Ser						
	340		345		350	
cct ggg ggg ctg tcg cta ggc aat gtc act gcc tgg caa cag cca cag						1104
Pro Gly Gly Leu Ser Leu Gly Asn Val Thr Ala Trp Gln Gln Pro Gln						
	355		360		365	
cag ccc cag cag ccg cag cag cca cag cct cca cag cag cag cca ccg						1152
Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gln Gln Gln Pro Pro						
	370		375		380	
cag cca cag cag cca cag cca cag cag cct cag cag ccg caa cag cca						1200
Gln Pro Gln Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro						
385		390		395		400
cct cag caa cag tcc cac ctg gtc cct gta tct ctc agc aac ctc atc						1248
Pro Gln Gln Gln Ser His Leu Val Pro Val Ser Leu Ser Asn Leu Ile						
	405		410		415	
ccg ggc agc ccc ctg ccc cac gtg ggt gct gcc ctc aca gtc acc acc						1296
Pro Gly Ser Pro Leu Pro His Val Gly Ala Ala Leu Thr Val Thr Thr						
	420		425		430	
cac ccc cac atc agc atc aag tca gaa ccg gtg tcc cca agc cgt gag						1344
His Pro His Ile Ser Ile Lys Ser Glu Pro Val Ser Pro Ser Arg Glu						

435 440 445
 cgc agc cct gcg cct ccc cct cca gct gtg ttc cca gct gcc cgc cct 1392
 Arg Ser Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Val Phe Pro Ala Ala Arg Pro
 450 455 460
 gag cct ggc gat ggt ctc agc agc cca gcc ggg gga tcc tat gag acg 1440
 Glu Pro Gly Asp Gly Leu Ser Ser Pro Ala Gly Gly Ser Tyr Glu Thr
 465 470 475 480
 gga gac cgg gat gac gga cgg ggg gac ttc ggg ccc aca ctg ggc ctg 1488
 Gly Asp Arg Asp Asp Gly Arg Gly Asp Phe Gly Pro Thr Leu Gly Leu
 485 490 495
 ctg cgc cca gcc cca gag cct gag gct gag ggc tca gct gtg aag agg 1536
 Leu Arg Pro Ala Pro Glu Pro Glu Ala Glu Gly Ser Ala Val Lys Arg
 500 505 510
 atg cgg ctt gat acc tgg aca tta aag 1563
 Met Arg Leu Asp Thr Trp Thr Leu Lys
 515 520

<210> 21

<211> 217

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 21

Met Ser Leu Val Gly Gly Phe Pro His His Pro Val Val His His Glu
 1 5 10 15
 Gly Tyr Pro Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 20 25 30
 Ser Arg Cys Ser His Glu Glu Asn Pro Tyr Phe His Gly Trp Leu Ile
 35 40 45
 Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr
 50 55 60
 Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala Gly Leu Asp His Ser His Tyr
 65 70 75 80
 Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg
 85 90 95
 Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr
 100 105 110
 Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn

115	120	125	
Val Pro Ala Asp Thr Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala			
130	135	140	
Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln			
145	150	155	160
Asn Gly Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val			
165	170	175	
Lys Glu Glu Lys Arg Lys Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr			
180	185	190	
Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln			
195	200	205	
His Val Trp Ala Leu Glu Leu Lys Gln			
210	215		
<210> 22			
<211> 651			
<212> DNA			
<213> Rattus norvegicus			
<220>			
<221> CDS			
<223> (1)..(654)			
<400> 22			
atg agt ctg gtg ggg ggc ttt ccc cac cac ccc gtg gtg cac cat gag	48		
Met Ser Leu Val Gly Gly Phe Pro His His Pro Val Val His His Glu			
1 5 10 15			
ggc tac ccg ttc gcc gca gcc gca gcc gcc gct gct gct gcc gcc gcc	96		
Gly Tyr Pro Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala			
20 25 30			
agc cgc tgc agt cac gag gag aac ccc tat ttc cac ggc tgg ctt att	144		
Ser Arg Cys Ser His Glu Glu Asn Pro Tyr Phe His Gly Trp Leu Ile			
35 40 45			
ggc cac ccg gag atg tcg ccc ccc gac tac agc atg gcc ctg tcc tac	192		
Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr			
50 55 60			
agt ccc gag tac gcc agc ggt gcc gcg ggc ctg gac cac tcc cat tat	240		
Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala Gly Leu Asp His Ser His Tyr			
65 70 75 80			

ggg gga gtg ccg ccc ggt gcc ggg cct ccc ggc ctg ggg ggg ccg cgc 288
 Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg
 85 90 95
 ccg gtg aag cgt cgg ggc acc gcc aac cgc aag gag cgg cgc agg act 336
 Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr
 100 105 110
 cag agc atc aac agc gcc ttc gcc gag ctg cgc gag tgc atc ccc aac 384
 Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn
 115 120 125
 gtg ccc gcc gac acc aaa ctc tcc aaa atc aag act ctg cgc ctg gcc 432
 Val Pro Ala Asp Thr Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala
 130 135 140
 acc agc tac atc gcc tac ctc atg gat ctg ctg gcc aag gac gac cag 480
 Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln
 145 150 155 160
 aac gga gag gcg gag gcc ttc aag gcg gag atc aag aag acc gac gtg 528
 Asn Gly Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val
 165 170 175
 aaa gag gag aag agg aag aaa gag ctg aat gaa atc ttg aaa agt aca 576
 Lys Glu Glu Lys Arg Lys Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr
 180 185 190
 gtg agc agc aac gac aag aaa acc aaa ggc cgg aca ggc tgg cca cag 624
 Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln
 195 200 205
 cac gtc tgg gcc ctg gag ctc aag cag 651
 His Val Trp Ala Leu Glu Leu Lys Gln
 210 215

<210> 23

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Asn Leu Val Gly Ser Tyr Ala His His His His His His His Pro
 1 5 10 15
 His Pro Ala His Pro Met Leu His Glu Pro Phe Leu Phe Gly Pro Ala
 20 25 30

Ser Arg Cys His Gln Glu Arg Pro Tyr Phe Gln Ser Trp Leu Leu Ser
 35 40 45
 Pro Ala Asp Ala Ala Pro Asp Phe Pro Ala Gly Gly Pro Pro Pro Ala
 50 55 60
 Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Asp Ala Arg Pro Gly Gln
 65 70 75 80
 Ser Pro Gly Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Arg Leu Gly Arg Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Gly Pro Lys Lys Glu Arg Arg Arg Thr Glu Ser Ile Asn Ser
 100 105 110
 Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn Val Pro Ala Asp Thr
 115 120 125
 Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala Thr Ser Tyr Ile Ala
 130 135 140
 Tyr Leu Met Asp Val Leu Ala Lys Asp Ala Gln Ser Gly Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Ala Phe Lys Ala Glu Leu Lys Lys Ala Asp Gly Gly Arg Glu Ser Lys
 165 170 175
 Arg Lys Arg Glu Leu Gln Gln His Glu Gly Phe Pro Pro Ala Leu Gly
 180 185 190
 Pro Val Glu Lys Arg Ile Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln Gln Val
 195 200 205
 Trp Ala Leu Glu Leu Asn Gln
 210

<210> 24

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(648)

<400> 24

atg aac ctc gtg ggc agc tac gca cac cat cac cac cat cac cac ccg 48
 Met Asn Leu Val Gly Ser Tyr Ala His His His His His His His Pro
 1 5 10 15
 cac cct gcg cac ccc atg ctc cac gaa ccc ttc ctc ttc ggt ccg gcc 96

His	Pro	Ala	His	Pro	Met	Leu	His	Glu	Pro	Phe	Leu	Phe	Gly	Pro	Ala		
			20					25					30				
tgc	cgc	tgt	cat	cag	gaa	agg	ccc	tac	ttc	cag	agc	tgg	ctg	ctg	agc	144	
Ser	Arg	Cys	His	Gln	Glu	Arg	Pro	Tyr	Phe	Gln	Ser	Trp	Leu	Leu	Ser		
		35					40					45					
ccg	gct	gac	gct	gcc	ccg	gac	ttc	cct	gcg	ggc	ggg	ccg	ccg	ccc	gcg	192	
Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Asp	Phe	Pro	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Ala		
		50					55				60						
gcc	gct	gca	gcc	gcc	acc	gcc	tat	ggt	cct	gac	gcc	agg	cct	ggg	cag	240	
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Arg	Pro	Gly	Gln		
65					70				75				80				
agc	ccc	ggg	cgg	ctg	gag	gcg	ctt	ggc	ggc	cgt	ctt	ggc	cgg	cgg	aaa	288	
Ser	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Arg	Leu	Gly	Arg	Arg	Lys		
			85					90				95					
ggc	tca	gga	ccc	aag	aag	gag	cgg	aga	cgc	act	gag	agc	att	aac	agc	336	
Gly	Ser	Gly	Pro	Lys	Lys	Glu	Arg	Arg	Arg	Thr	Glu	Ser	Ile	Asn	Ser		
			100				105					110					
gca	ttc	gcg	gag	ttg	cgc	gag	tgc	atc	ccc	aac	gtg	ccg	gcc	gac	acc	384	
Ala	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Cys	Ile	Pro	Asn	Val	Pro	Ala	Asp	Thr		
		115					120					125					
aag	ctc	tcc	aag	atc	aag	act	ctg	cgc	cta	gcc	acc	agc	tac	atc	gcc	432	
Lys	Leu	Ser	Lys	Ile	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Ala	Thr	Ser	Tyr	Ile	Ala		
		130					135					140					
tac	ctg	atg	gac	gtg	ctg	gcc	aag	gat	gca	cag	tct	ggc	gat	ccc	gag	480	
Tyr	Leu	Met	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Asp	Ala	Gln	Ser	Gly	Asp	Pro	Glu		
145					150				155				160				
gcc	ttc	aag	gct	gaa	ctc	aag	aag	gcg	gat	ggc	ggc	cgt	gag	agc	aag	528	
Ala	Phe	Lys	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Asp	Gly	Gly	Arg	Glu	Ser	Lys		
			165					170				175					
cgg	aaa	agg	gag	ctg	cag	cag	cac	gaa	ggt	ttt	cct	cct	gcc	ctg	ggc	576	
Arg	Lys	Arg	Glu	Leu	Gln	Gln	His	Glu	Gly	Phe	Pro	Pro	Ala	Leu	Gly		
			180					185				190					
cca	gtc	gag	aag	agg	att	aaa	gga	cgc	acc	ggc	tgg	ccg	cag	caa	gtc	624	
Pro	Val	Glu	Lys	Arg	Ile	Lys	Gly	Arg	Thr	Gly	Trp	Pro	Gln	Gln	Val		
		195					200					205					
tgg	gcg	ctg	gag	tta	aac	cag										645	

Trp Ala Leu Glu Leu Asn Gln

210

215

<210> 25

<211> 411

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Glu Arg Met Ser Asp Ser Ala Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala

1

5

10

15

Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu

20

25

30

Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu

35

40

45

Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu

50

55

60

Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln

65

70

75

80

Val Leu Ala Arg Arg Lys Ser Arg Asp Phe His Ser Lys Leu Lys Asp

85

90

95

Gln Thr Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln His Met Ala Ala Met Ser Ser

100

105

110

Ala Gln Ile Val Ser Ala Thr Ala Ile His Asn Lys Leu Gly Leu Pro

115

120

125

Gly Ile Pro Arg Pro Thr Phe Pro Gly Ala Pro Gly Phe Trp Pro Gly

130

135

140

Met Ile Gln Thr Gly Gln Pro Gly Ser Ser Gln Asp Val Lys Pro Phe

145

150

155

160

Val Gln Gln Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Ala Val Thr Ala Pro Ile Pro

165

170

175

Gly Phe Glu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ser Val Pro Ala Trp Gln

180

185

190

Gly Arg Ser Ile Gly Thr Thr Lys Leu Arg Leu Val Glu Phe Ser Ala

195

200

205

Phe Leu Glu Gln Gln Arg Asp Pro Asp Ser Tyr Asn Lys His Leu Phe

210

215

220

Val His Ile Gly His Ala Asn His Ser Tyr Ser Asp Pro Leu Leu Glu

225 230 235 240
 Ser Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly
 245 250 255
 Gly Leu Lys Glu Leu Phe Gly Lys Gly Pro Gln Asn Ala Phe Phe Leu
 260 265 270
 Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Cys Asn Ile Gln Asp Asp Ala Gly
 275 280 285
 Ala Phe Tyr Gly Val Thr Ser Gln Tyr Glu Ser Ser Glu Asn Met Thr
 290 295 300
 Val Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu
 305 310 315 320
 Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Phe Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr
 325 330 335
 Arg Ile Asn Arg Ser Pro Met Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His
 340 345 350
 Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu
 355 360 365
 Asn Phe Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr
 370 375 380
 Leu Leu Cys Met Ala Cys Val Phe Glu Val Ser Asn Ser Glu His Gly
 385 390 395 400
 Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Asp
 405 410

<210> 26

<211> 1233

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1236)

<400> 26

atg gaa agg atg agt gac tct gca gat aag cca att gac aat gat gca 48
 Met Glu Arg Met Ser Asp Ser Ala Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala
 1 5 10 15
 gaa ggg gtc tgg agc ccc gac atc gag caa agc ttt cag gag gcc ctg 96
 Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu

	20		25		30	
gct atc tat cca cca tgt ggg agg agg aaa atc atc tta tca gac gaa						144
Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu						
	35		40		45	
ggc aaa atg tat ggt agg aat gaa ttg ata gcc aga tac atc aaa ctc						192
Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu						
	50		55		60	
agg aca ggc aag acg agg acc aga aaa cag gtg tct agt cac att cag						240
Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln						
	65		70		75	80
gtt ctt gcc aga agg aaa tct cgt gat ttt cat tcc aag cta aag gat						288
Val Leu Ala Arg Arg Lys Ser Arg Asp Phe His Ser Lys Leu Lys Asp						
		85		90		95
cag act gca aag gat aag gcc ctg cag cac atg gcg gcc atg tcc tca						336
Gln Thr Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln His Met Ala Ala Met Ser Ser						
	100		105		110	
gcc cag atc gtc tcg gcc act gcc att cat aac aag ctg ggg ctg cct						384
Ala Gln Ile Val Ser Ala Thr Ala Ile His Asn Lys Leu Gly Leu Pro						
	115		120		125	
ggg att cca cgc ccg acc ttc cca ggg gcg ccg ggg ttc tgg ccg gga						432
Gly Ile Pro Arg Pro Thr Phe Pro Gly Ala Pro Gly Phe Trp Pro Gly						
	130		135		140	
atg att caa aca ggg cag cca gga tcc tca caa gac gtc aag cct ttt						480
Met Ile Gln Thr Gly Gln Pro Gly Ser Ser Gln Asp Val Lys Pro Phe						
	145		150		155	160
gtg cag cag gcc tac ccc atc cag cca gcg gtc aca gcc ccc att cca						528
Val Gln Gln Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Ala Val Thr Ala Pro Ile Pro						
		165		170		175
ggg ttt gag cct gca tcg gcc cca gct ccc tca gtc cct gcc tgg caa						576
Gly Phe Glu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ser Val Pro Ala Trp Gln						
	180		185		190	
ggt cgc tcc att ggc aca acc aag ctt cgc ctg gtg gaa ttt tca gct						624
Gly Arg Ser Ile Gly Thr Thr Lys Leu Arg Leu Val Glu Phe Ser Ala						
	195		200		205	
ttt ctc gag cag cag cga gac cca gac tcg tac aac aaa cac ctc ttc						672
Phe Leu Glu Gln Gln Arg Asp Pro Asp Ser Tyr Asn Lys His Leu Phe						

210	215	220	
gtg cac att ggg cat gcc aac cat tct tac agt gac cca ttg ctt gaa	720		
Val His Ile Gly His Ala Asn His Ser Tyr Ser Asp Pro Leu Leu Glu			
225	230	235	240
tca gtg gac att cgt cag att tat gac aaa ttt cct gaa aag aaa ggt	768		
Ser Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly			
245	250	255	
ggc tta aag gaa ctg ttt gga aag ggc cct caa aat gcc ttc ttc ctc	816		
Gly Leu Lys Glu Leu Phe Gly Lys Gly Pro Gln Asn Ala Phe Phe Leu			
260	265	270	
gta aaa ttc tgg gct gat tta aac tgc aat att caa gat gat gct ggg	864		
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Cys Asn Ile Gln Asp Asp Ala Gly			
275	280	285	
gct ttt tat ggt gta acc agt cag tac gag agt tct gaa aat atg aca	912		
Ala Phe Tyr Gly Val Thr Ser Gln Tyr Glu Ser Ser Glu Asn Met Thr			
290	295	300	
gtc acc tgt tcc acc aaa gtt tgc tcc ttt ggg aag caa gta gta gaa	960		
Val Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu			
305	310	315	320
aaa gta gag acg gag tat gca agg ttt gag aat ggc cga ttt gta tac	1008		
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Phe Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr			
325	330	335	
cga ata aac cgc tcc cca atg tgt gaa tat atg atc aac ttc atc cac	1056		
Arg Ile Asn Arg Ser Pro Met Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His			
340	345	350	
aag ctc aaa cac tta cca gag aaa tat atg atg aac agt gtt ttg gaa	1104		
Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu			
355	360	365	
aac ttc aca att tta ttg gtg gta aca aac agg gat aca caa gaa act	1152		
Asn Phe Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr			
370	375	380	
cta ctc tgc atg gcc tgt gtg ttt gaa gtt tca aat agt gaa cac gga	1200		
Leu Leu Cys Met Ala Cys Val Phe Glu Val Ser Asn Ser Glu His Gly			
385	390	395	400
gca caa cat cat att tac agg ctt gta aag gac	1233		
Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Asp			

405 410
 <210> 27
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Ile Thr Ser Asn Glu Trp Ser Ser Pro Thr Ser Pro Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Gly Ser Gln Ala Leu Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala
 20 25 30
 Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu
 35 40 45
 Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu
 50 55 60
 Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu
 65 70 75 80
 Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln
 85 90 95
 Val Leu Ala Arg Arg Lys Ala Arg Glu Ile Gln Ala Lys Leu Lys Asp
 100 105 110
 Gln Ala Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ala Met Ser Ser
 115 120 125
 Ala Gln Ile Ile Ser Ala Thr Ala Phe His Ser Ser Met Ala Leu Ala
 130 135 140
 Arg Gly Pro Gly Arg Pro Ala Val Ser Gly Phe Trp Gln Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Pro Gly Gln Ala Gly Thr Ser His Asp Val Lys Pro Phe Ser Gln Gln
 165 170 175
 Thr Tyr Ala Val Gln Pro Pro Leu Pro Leu Pro Gly Phe Glu Ser Pro
 180 185 190
 Ala Gly Pro Ala Pro Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Trp Gln
 195 200 205
 Gly Arg Ser Val Ala Ser Ser Lys Leu Trp Met Leu Glu Phe Ser Ala
 210 215 220
 Phe Leu Glu Gln Gln Gln Asp Pro Asp Thr Tyr Asn Lys His Leu Phe
 225 230 235 240

Val His Ile Gly Gln Ser Ser Pro Ser Tyr Ser Asp Pro Tyr Leu Glu
 245 250 255
 Ala Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly
 260 265 270
 Gly Leu Lys Asp Leu Phe Glu Arg Gly Pro Ser Asn Ala Phe Phe Leu
 275 280 285
 Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Thr Asn Ile Glu Asp Glu Gly Ser
 290 295 300
 Ser Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln Tyr Glu Ser Pro Glu Asn Met Ile
 305 310 315 320
 Ile Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu
 325 330 335
 Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Tyr Glu Asn Gly His Tyr Ser Tyr
 340 345 350
 Arg Ile His Arg Ser Pro Leu Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His
 355 360 365
 Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu
 370 375 380
 Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr
 385 390 395 400
 Leu Leu Cys Ile Ala Tyr Val Phe Glu Val Ser Ala Ser Glu His Gly
 405 410 415
 Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Glu
 420 425

<210> 28

<211> 1281

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1284)

<400> 28

att acc tcc aac gag tgg agc tct ccc acc tcc cct gag ggg agc acc 48
 Ile Thr Ser Asn Glu Trp Ser Ser Pro Thr Ser Pro Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 gcc tct ggg ggc agt cag gca ctg gac aag ccc atc gac aat gac gca 96

Ala Ser Gly Gly Ser Gln Ala Leu Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala	
20 25 30	
gag ggc gtg tgg agc ccg gat att gag cag agt ttc cag gag gcc ctc	144
Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu	
35 40 45	
gcc atc tac ccg ccc tgt ggc agg cgc aaa atc atc ctg tcg gac gag	192
Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu	
50 55 60	
ggc aag atg tat ggt cgg aac gag ctg att gcc cgc tac atc aag ctc	240
Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu	
65 70 75 80	
cgg aca ggg aag acc cgc acc agg aag cag gtc tcc agc cac atc cag	288
Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln	
85 90 95	
gtg ctg gct cgt cgc aaa gct cgc gag atc cag gcc aag cta aag gac	336
Val Leu Ala Arg Arg Lys Ala Arg Glu Ile Gln Ala Lys Leu Lys Asp	
100 105 110	
cag gca gct aag gac aag gcc ctg cag agc atg gct gcc atg tcg tct	384
Gln Ala Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ala Met Ser Ser	
115 120 125	
gca cag atc atc tcc gcc acg gcc ttc cac agt agc atg gcc ctc gcc	432
Ala Gln Ile Ile Ser Ala Thr Ala Phe His Ser Ser Met Ala Leu Ala	
130 135 140	
cgg ggc ccc ggc cgc cca gca gtc tca ggg ttt tgg caa gga gct ttg	480
Arg Gly Pro Gly Arg Pro Ala Val Ser Gly Phe Trp Gln Gly Ala Leu	
145 150 155 160	
cca ggc caa gcc gga acg tcc cat gat gtg aag cct ttc tct cag caa	528
Pro Gly Gln Ala Gly Thr Ser His Asp Val Lys Pro Phe Ser Gln Gln	
165 170 175	
acc tat gct gtc cag cct ccg ctg cct ctg cca ggg ttt gag tct cct	576
Thr Tyr Ala Val Gln Pro Pro Leu Pro Leu Pro Gly Phe Glu Ser Pro	
180 185 190	
gca ggg ccc gcc cca tcg ccc tct gcg ccc ccg gca ccc cca tgg cag	624
Ala Gly Pro Ala Pro Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Trp Gln	
195 200 205	
ggc cgc agc gtg gcc agc tcc aag ctc tgg atg ttg gag ttc tct gcc	672

Gly	Arg	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Lys	Leu	Trp	Met	Leu	Glu	Phe	Ser	Ala		
210							215				220						
ttc	ctg	gag	cag	cag	cag	gac	ccg	gac	acg	tac	aac	aag	cac	ctg	ttc	720	
Phe	Leu	Glu	Gln	Gln	Gln	Asp	Pro	Asp	Thr	Tyr	Asn	Lys	His	Leu	Phe		
225						230				235					240		
gtg	cac	att	ggc	cag	tcc	agc	cca	agc	tac	agc	gac	ccc	tac	ctc	gaa	768	
Val	His	Ile	Gly	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ser	Asp	Pro	Tyr	Leu	Glu		
			245						250					255			
gcc	gtg	gac	atc	cgc	caa	atc	tat	gac	aaa	ttc	ccg	gag	aaa	aag	ggc	816	
Ala	Val	Asp	Ile	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asp	Lys	Phe	Pro	Glu	Lys	Lys	Gly		
		260						265				270					
gga	ctc	aag	gat	ctc	ttc	gaa	cgg	gga	ccc	tcc	aat	gcc	ttt	ttt	ctt	864	
Gly	Leu	Lys	Asp	Leu	Phe	Glu	Arg	Gly	Pro	Ser	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu		
	275					280					285						
gtg	aag	ttc	tgg	gca	gac	ctc	aac	acc	aac	atc	gag	gat	gaa	ggc	agc	912	
Val	Lys	Phe	Trp	Ala	Asp	Leu	Asn	Thr	Asn	Ile	Glu	Asp	Glu	Gly	Ser		
	290					295				300							
tcc	ttc	tat	ggg	gtc	tcc	agc	cag	tat	gag	agc	ccc	gag	aac	atg	atc	960	
Ser	Phe	Tyr	Gly	Val	Ser	Ser	Gln	Tyr	Glu	Ser	Pro	Glu	Asn	Met	Ile		
305					310				315					320			
atc	acc	tgc	tcc	acg	aag	gtc	tgc	tct	ttc	ggc	aag	cag	gtg	gtg	gag	1008	
Ile	Thr	Cys	Ser	Thr	Lys	Val	Cys	Ser	Phe	Gly	Lys	Gln	Val	Val	Glu		
			325						330				335				
aaa	gtt	gag	aca	gag	tat	gct	cgc	tat	gag	aat	gga	cac	tac	tct	tac	1056	
Lys	Val	Glu	Thr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Tyr	Glu	Asn	Gly	His	Tyr	Ser	Tyr		
		340				345					350						
cgc	atc	cac	cgg	tcc	ccg	ctc	tgt	gag	tac	atg	atc	aac	ttc	atc	cac	1104	
Arg	Ile	His	Arg	Ser	Pro	Leu	Cys	Glu	Tyr	Met	Ile	Asn	Phe	Ile	His		
	355					360					365						
aag	ctc	aag	cac	ctc	cct	gag	aag	tac	atg	atg	aac	agc	gtg	ctg	gag	1152	
Lys	Leu	Lys	His	Leu	Pro	Glu	Lys	Tyr	Met	Met	Asn	Ser	Val	Leu	Glu		
	370					375					380						
aac	ttc	acc	atc	ctg	cag	gtg	gtc	acc	aac	aga	gac	aca	cag	gag	acc	1200	
Asn	Phe	Thr	Ile	Leu	Gln	Val	Val	Thr	Asn	Arg	Asp	Thr	Gln	Glu	Thr		
385					390				395					400			
ttg	ctg	tgc	att	gcc	tat	gtc	ttt	gag	gtg	tca	gcc	agt	gag	cac	ggg	1248	

Leu Leu Cys Ile Ala Tyr Val Phe Glu Val Ser Ala Ser Glu His Gly
 405 410 415
 gct cag cac cac atc tac agg ctg gtg aaa gaa 1281
 Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Glu
 420 425
 <210> 29
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Ile Ala Ser Asn Ser Trp Asn Ala Ser Ser Ser Pro Gly Glu Ala Arg
 1 5 10 15
 Glu Asp Gly Pro Glu Gly Leu Asp Lys Gly Leu Asp Asn Asp Ala Glu
 20 25 30
 Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu Ala
 35 40 45
 Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu Gly
 50 55 60
 Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu Arg
 65 70 75 80
 Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln Val
 85 90 95
 Leu Ala Arg Lys Lys Val Arg Glu Tyr Gln Val Gly Ile Lys Ala Met
 100 105 110
 Asn Leu Asp Gln Val Ser Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ser
 115 120 125
 Met Ser Ser Ala Gln Ile Val Ser Ala Ser Val Leu Gln Asn Lys Phe
 130 135 140
 Ser Pro Pro Ser Pro Leu Pro Gln Ala Val Phe Ser Thr Ser Ser Arg
 145 150 155 160
 Phe Trp Ser Ser Pro Pro Leu Leu Gly Gln Gln Pro Gly Pro Ser Gln
 165 170 175
 Asp Ile Lys Pro Phe Ala Gln Pro Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Pro Leu
 180 185 190
 Pro Pro Thr Leu Ser Ser Tyr Glu Pro Leu Ala Pro Leu Pro Ser Ala
 195 200 205

Ala Ala Ser Val Pro Val Trp Gln Asp Arg Thr Ile Ala Ser Ser Arg
 210 215 220
 Leu Arg Leu Leu Glu Tyr Ser Ala Phe Met Glu Val Gln Arg Asp Pro
 225 230 235 240
 Asp Thr Tyr Ser Lys His Leu Phe Val His Ile Gly Gln Thr Asn Pro
 245 250 255
 Ala Phe Ser Asp Pro Pro Leu Glu Ala Val Asp Val Arg Gln Ile Tyr
 260 265 270
 Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly Gly Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Lys
 275 280 285
 Gly Pro Pro Asn Ala Phe Phe Leu Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn
 290 295 300
 Ser Thr Ile Gln Glu Gly Pro Gly Ala Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln
 305 310 315 320
 Tyr Ser Ser Ala Asp Ser Met Thr Ile Ser Val Ser Thr Lys Val Cys
 325 330 335
 Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg
 340 345 350
 Leu Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr Arg Ile His Arg Ser Pro Met Cys
 355 360 365
 Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys
 370 375 380
 Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val
 385 390 395 400
 Thr Ser Arg Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu Val Ile Ala Phe Val Phe
 405 410 415
 Glu Val Ser Thr Ser Glu His Gly Ala Gln His His Val Tyr Lys Leu
 420 425 430

Val Lys Asp

<210> 30

<211> 1305

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1305)

<400> 30

ata gcg tcc aac agc tgg aac gcc agc agc agc ccc ggg gag gcc cgg	48
Ile Ala Ser Asn Ser Trp Asn Ala Ser Ser Ser Pro Gly Glu Ala Arg	
1 5 10 15	
gag gat ggg ccc gag ggc ctg gac aag ggg ctg gac aac gat gcg gag	96
Glu Asp Gly Pro Glu Gly Leu Asp Lys Gly Leu Asp Asn Asp Ala Glu	
20 25 30	
ggc gtg tgg agc ccg gac atc gag cag agc ttc cag gag gcc ctg gcc	144
Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu Ala	
35 40 45	
atc tac ccg ccc tgc ggc cgg cgg aag atc atc ctg tca gac gag ggc	192
Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu Gly	
50 55 60	
aag atg tac ggc cga aat gag ttg att gca cgc tat att aaa ctg agg	240
Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu Arg	
65 70 75 80	
acg ggg aag act cgg acg aga aaa cag gtg tcc agc cac ata cag gtt	288
Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln Val	
85 90 95	
cta gct cgg aag aag gtg cgg gag tac cag gtt ggc atc aag gcc atg	336
Leu Ala Arg Lys Lys Val Arg Glu Tyr Gln Val Gly Ile Lys Ala Met	
100 105 110	
aac ctg gac cag gtc tcc aag gac aaa gcc ctt cag agc atg gcg tcc	384
Asn Leu Asp Gln Val Ser Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ser	
115 120 125	
atg tcc tct gcc cag atc gtc tct gcc agt gtc ctg cag aac aag ttc	432
Met Ser Ser Ala Gln Ile Val Ser Ala Ser Val Leu Gln Asn Lys Phe	
130 135 140	
agc cca cct tcc cct ctg ccc cag gcc gtc ttc tcc act tcc tcg cgg	480
Ser Pro Pro Ser Pro Leu Pro Gln Ala Val Phe Ser Thr Ser Ser Arg	
145 150 155 160	
ttc tgg agc agc ccc cct ctc ctg gga cag cag cct gga ccc tct cag	528
Phe Trp Ser Ser Pro Pro Leu Leu Gly Gln Gln Pro Gly Pro Ser Gln	
165 170 175	
gac atc aag ccc ttt gca cag cca gcc tac ccc atc cag ccg ccc ctg	576
Asp Ile Lys Pro Phe Ala Gln Pro Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Pro Leu	

180	185	190	
ccg ccg acg ctc agc agt tat gag ccc ctg gcc ccg ctc ccc tca gct	624		
Pro Pro Thr Leu Ser Ser Tyr Glu Pro Leu Ala Pro Leu Pro Ser Ala			
195	200	205	
gct gcc tct gtg cct gtg tgg cag gac cgt acc att gcc tcc tcc cgg	672		
Ala Ala Ser Val Pro Val Trp Gln Asp Arg Thr Ile Ala Ser Ser Arg			
210	215	220	
ctg cgg ctc ctg gag tat tca gcc ttc atg gag gtg cag cga gac cct	720		
Leu Arg Leu Leu Glu Tyr Ser Ala Phe Met Glu Val Gln Arg Asp Pro			
225	230	235	240
gac acg tac agc aaa cac ctg ttt gtg cac atc ggc cag acg aac ccc	768		
Asp Thr Tyr Ser Lys His Leu Phe Val His Ile Gly Gln Thr Asn Pro			
245	250	255	
gcc ttc tca gac cca ccc ctg gag gca gta gat gtg cgc cag atc tat	816		
Ala Phe Ser Asp Pro Pro Leu Glu Ala Val Asp Val Arg Gln Ile Tyr			
260	265	270	
gac aaa ttc ccc gag aaa aag gga gga ttg aag gag ctc tat gag aag	864		
Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly Gly Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Lys			
275	280	285	
ggg ccc cct aat gcc ttc ttc ctt gtc aag ttc tgg gcc gac ctc aac	912		
Gly Pro Pro Asn Ala Phe Phe Leu Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn			
290	295	300	
agc acc atc cag gag ggc ccg gga gcc ttc tat ggg gtc agc tct cag	960		
Ser Thr Ile Gln Glu Gly Pro Gly Ala Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln			
305	310	315	320
tac agc tct gct gat agc atg acc atc agc gtc tcc acc aag gtg tgc	1008		
Tyr Ser Ser Ala Asp Ser Met Thr Ile Ser Val Ser Thr Lys Val Cys			
325	330	335	
tcc ttt ggc aaa cag gtg gta gag aag gtg gag act gag tat gcc agg	1056		
Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg			
340	345	350	
ctg gag aac ggg cgc ttt gtg tac cgt atc cac cgc tcg ccc atg tgc	1104		
Leu Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr Arg Ile His Arg Ser Pro Met Cys			
355	360	365	
gag tac atg atc aac ttc atc cac aag ctg aag cac ctg ccc gag aag	1152		
Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys			

370	375	380	
tac atg atg aac agc gtg ctg gag aac ttc acc atc ctg cag gtg gtc			1200
Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val			
385	390	395	400
acg agc cgg gac tcc cag gag acc ttg ctt gtc att gct ttt gtc ttc			1248
Thr Ser Arg Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu Val Ile Ala Phe Val Phe			
405	410	415	
gaa gtc tcc acc agt gag cac ggg gcc cag cac cat gtc tac aag ctc			1296
Glu Val Ser Thr Ser Glu His Gly Ala Gln His His Val Tyr Lys Leu			
420	425	430	
gtc aaa gac			1305
Val Lys Asp			
435			
<210> 31			
<211> 1132			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 31			
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser			
1 5 10 15			
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly			
20 25 30			
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg			
35 40 45			
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro			
50 55 60			
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu			
65 70 75 80			
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val			
85 90 95			
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro			
100 105 110			
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr			
115 120 125			
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val			
130 135 140			

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
 165 170 175
 Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
 180 185 190
 Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
 195 200 205
 Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
 210 215 220
 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
 225 230 235 240
 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
 245 250 255
 Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
 260 265 270
 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
 275 280 285
 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
 290 295 300
 Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
 305 310 315 320
 Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
 325 330 335
 Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
 355 360 365
 Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
 385 390 395 400
 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
 405 410 415
 Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
 420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
 435 440 445
 Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
 450 455 460
 Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
 465 470 475 480
 Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
 485 490 495
 Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
 500 505 510
 Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
 515 520 525
 Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe
 530 535 540
 Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
 545 550 555 560
 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
 565 570 575
 Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
 580 585 590
 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
 595 600 605
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 610 615 620
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
 625 630 635 640
 Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
 645 650 655
 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
 660 665 670
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
 675 680 685
 Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
 690 695 700
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
 725 730 735
 Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
 740 745 750
 Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
 755 760 765
 Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
 770 775 780
 Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
 785 790 795 800
 Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
 805 810 815
 Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
 820 825 830
 Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
 835 840 845
 Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
 850 855 860
 Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala
 865 870 875 880
 Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys
 885 890 895
 Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu
 900 905 910
 Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe
 915 920 925
 Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser
 930 935 940
 Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
 945 950 955 960
 Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
 965 970 975
 Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
 980 985 990
 Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
 995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln
 1010 1015 1020
 Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala
 1025 1030 1035 1040
 Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
 1045 1050 1055
 Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp
 1060 1065 1070
 Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
 1075 1080 1085
 Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
 1090 1095 1100
 Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
 1105 1110 1115 1120
 Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
 1125 1130

<210> 32

<211> 3396

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(3399)

<400> 32

atg ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc 48
 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg 96
 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30
 ccc cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc 144
 Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45
 gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg 192
 Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60

ccc ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg	240
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu	
65 70 75 80	
gtg gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc ggc gcg aag aac gtg	288
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val	
85 90 95	
ctg gcc ttc ggc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg ggc ccc ccc	336
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro	
100 105 110	
gag gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc	384
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr	
115 120 125	
gac gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg	432
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val	
130 135 140	
ggc gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg	480
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val	
145 150 155 160	
ctg gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac	528
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr	
165 170 175	
cag ctc ggc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga	576
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly	
180 185 190	
ccc cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg	624
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg	
195 200 205	
gag gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc	672
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg	
210 215 220	
ggg ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt	720
Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg	
225 230 235 240	
ggc gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg	768
Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp	
245 250 255	

gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg 816
 Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
 260 265 270
 gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg 864
 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
 275 280 285
 ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac 912
 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
 290 295 300
 gcg ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct 960
 Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
 305 310 315 320
 tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc 1008
 Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
 325 330 335
 gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc 1056
 Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc 1104
 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
 355 360 365
 agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag 1152
 Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
 370 375 380
 cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac 1200
 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
 385 390 395 400
 gcg cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc ccg ctg cga 1248
 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
 405 410 415
 gct gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag 1296
 Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
 420 425 430
 ggc tct gtg gcg gcc ccc gag gag gag gac aca gac ccc cgt cgc ctg 1344
 Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
 435 440 445

gtg cag ctg ctc cgc cag cac agc agc ccc tgg cag gtg tac ggc ttc	1392
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe	
450 455 460	
gtg cgg gcc tgc ctg cgc cgg ctg gtg ccc cca ggc ctc tgg ggc tcc	1440
Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser	
465 470 475 480	
agg cac aac gaa cgc cgc ttc ctc agg aac acc aag aag ttc atc tcc	1488
Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser	
485 490 495	
ctg ggg aag cat gcc aag ctc tcg ctg cag gag ctg acg tgg aag atg	1536
Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met	
500 505 510	
agc gtg cgg gac tgc gct tgg ctg cgc agg agc cca ggg gtt ggc tgt	1584
Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys	
515 520 525	
gtt ccg gcc gca gag cac cgt ctg cgt gag gag atc ctg gcc aag ttc	1632
Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe	
530 535 540	
ctg cac tgg ctg atg agt gtg tac gtc gtc gag ctg ctc agg tct ttc	1680
Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe	
545 550 555 560	
ttt tat gtc acg gag acc acg ttt caa aag aac agg ctc ttt ttc tac	1728
Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr	
565 570 575	
cgg aag agt gtc tgg agc aag ttg caa agc att gga atc aga cag cac	1776
Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His	
580 585 590	
ttg aag agg gtg cag ctg cgg gag ctg tcg gaa gca gag gtc agg cag	1824
Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln	
595 600 605	
cat cgg gaa gcc agg ccc gcc ctg ctg acg tcc aga ctc cgc ttc atc	1872
His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile	
610 615 620	
ccc aag cct gac ggg ctg cgg ccg att gtg aac atg gac tac gtc gtg	1920
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val	
625 630 635 640	

gga gcc aga acg ttc cgc aga gaa aag agg gcc gag cgt ctc acc tcg	1968
Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser	
645 650 655	
agg gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc	2016
Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg	
660 665 670	
ccc ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg	2064
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg	
675 680 685	
gcc tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct	2112
Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro	
690 695 700	
gag ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc	2160
Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile	
705 710 715 720	
ccc cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag	2208
Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln	
725 730 735	
aac acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat	2256
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His	
740 745 750	
ggg cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac	2304
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp	
755 760 765	
ctc cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc	2352
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser	
770 775 780	
ccg ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag	2400
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu	
785 790 795 800	
gcc agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac	2448
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His	
805 810 815	
gcc gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg	2496
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro	
820 825 830	

cag ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac	2544
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp	
835 840 845	
atg gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc ctg	2592
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu	
850 855 860	
cgt ttg gtg gat gat ttc ttg ttg gtg aca cct cac ctc acc cac gcg	2640
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala	
865 870 875 880	
aaa acc ttc ctc agg acc ctg gtc cga ggt gtc cct gag tat ggc tgc	2688
Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys	
885 890 895	
gtg gtg aac ttg cgg aag aca gtg gtg aac ttc cct gta gaa gac gag	2736
Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu	
900 905 910	
gcc ctg ggt ggc acg gct ttt gtt cag atg ccg gcc cac ggc cta ttc	2784
Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe	
915 920 925	
ccc tgg tgc ggc ctg ctg ctg gat acc cgg acc ctg gag gtg cag agc	2832
Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser	
930 935 940	
gac tac tcc agc tat gcc cgg acc tcc atc aga gcc agt ctc acc ttc	2880
Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe	
945 950 955 960	
aac cgc ggc ttc aag gct ggg agg aac atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg	2928
Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly	
965 970 975	
gtc ttg cgg ctg aag tgt cac agc ctg ttt ctg gat ttg cag gtg aac	2976
Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn	
980 985 990	
agc ctc cag acg gtg tgc acc aac atc tac aag atc ctc ctg ctg cag	3024
Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln	
995 1000 1005	
gcg tac agg ttt cac gca tgt gtg ctg cag ctc cca ttt cat cag caa	3072
Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln	
1010 1015 1020	


```

gtt tgg aag aac ccc aca ttt ttc ctg cgc gtc atc tct gac acg gcc 3120
Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala
1025          1030          1035          1040
tcc ctc tgc tac tcc atc ctg aaa gcc aag aac gca ggg atg tcg ctg 3168
Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
          1045          1050          1055
ggg gcc aag ggc gcc gcc ggc cct ctg ccc tcc gag gcc gtg cag tgg 3216
Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp
          1060          1065          1070
ctg tgc cac caa gca ttc ctg ctc aag ctg act cga cac cgt gtc acc 3264
Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
          1075          1080          1085
tac gtg cca ctc ctg ggg tca ctc agg aca gcc cag acg cag ctg agt 3312
Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
          1090          1095          1100
cgg aag ctc ccg ggg acg acg ctg act gcc ctg gag gcc gca gcc aac 3360
Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
1105          1110          1115          1120
ccg gca ctg ccc tca gac ttc aag acc atc ctg gac 3396
Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
          1125          1130

```

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 33

ttggcttcca ggccataatt g

21

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 34

aagagggcag atctatcgga 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 35

atggatctcc tgaagtgct 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 36

aagagggcag atctatcgga 20

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 37

ggaagagtga gcggccatca agg 23

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 38

ctgctggaga ggttattcct cg 22

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 39

gccaacacca acctgtccaa gttc 24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 40

tgcaaaggct ccaggtctga gggc 24

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 41

ctctctctcc tcaggacaa 19

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 42

tggagcaaaa cagaatggct gg 22

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 43

ctgagatgtc tctctctctc ttag 24

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 44

acaatgactg atgagagatg 20

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 45

cagacctgaa ggagacct 18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 46

gtcagcgtaa acagttgc 18

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 47

gccaaagaagc ggatagaagg 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 48

ctgtggttca gggctcagtc 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 49

cagtggagct ggacaaagcc 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 50

tagcgacggt tctggaacca 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 51

ctgtcatctc actatgggca 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 52

ccaagtccga gcaggaattt 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 53

aagacgtcaa gccctttgtg 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 54

aaaggagcac actttggtgg 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 55

agcaagaata cgatgccatc 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 56

gaaggggtgg tggtaggtc 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 57

tggaatggc tatgtcagtg 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 58

ctggtaatct gtgtttagg 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 59

caagggcctc tccaaacttg 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 60

gccccagaga cagcattcca 20

<210> 61

<211> 268

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Met	Ala	Gln	Pro	Leu	Cys	Pro	Pro	Leu	Ser	Glu	Ser	Trp	Met	Leu	Ser
1				5					10					15	

Ala	Ala	Trp	Gly	Pro	Thr	Arg	Arg	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Lys	Asp	Cys
			20					25					30		

Gly	Arg	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Pro	Asp	Ser	Trp	Gly	Ser	Thr	Pro	Ala
			35					40				45			

Asp Ser Pro Val Ala Ser Pro Ala Arg Pro Gly Thr Leu Arg Asp Pro
 50 55 60

Arg Ala Pro Ser Val Gly Arg Arg Gly Ala Arg Ser Ser Arg Leu Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gln Arg Gln Ser Ala Ser Glu Arg Glu Lys Leu Arg Met Arg
 85 90 95

Thr Leu Ala Arg Ala Leu His Glu Leu Arg Arg Phe Leu Pro Pro Ser
 100 105 110

Val Ala Pro Ala Gly Gln Ser Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Leu
 115 120 125

Ala Ile Arg Tyr Ile Gly His Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Ser Glu
 130 135 140

Glu Ser Leu Gln Arg Arg Cys Arg Gln Arg Gly Asp Ala Gly Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Gly Cys Pro Leu Cys Pro Asp Asp Cys Pro Ala Gln Met Gln Thr
 165 170 175

Arg Thr Gln Ala Glu Gly Gln Gly Gln Gly Arg Gly Leu Gly Leu Val
 180 185 190

Ser Ala Val Arg Ala Gly Ala Ser Trp Gly Ser Pro Pro Ala Cys Pro
 195 200 205

Gly Ala Arg Ala Ala Pro Glu Pro Arg Asp Pro Pro Ala Leu Phe Ala
 210 215 220

Glu Ala Ala Cys Pro Glu Gly Gln Ala Met Glu Pro Ser Pro Pro Ser
 225 230 235 240

acg ctg gcc cgc gcc ctg cac gag ctg cgc cgc ttt cta ccg ccg tcc	336
Thr Leu Ala Arg Ala Leu His Glu Leu Arg Arg Phe Leu Pro Pro Ser	
100 105 110	
gtg gcg ccc gcg ggc cag agc ctg acc aag atc gag acg ctg cgc ctg	384
Val Ala Pro Ala Gly Gln Ser Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Leu	
115 120 125	
gct atc cgc tat atc ggc cac ctg tcg gcc gtg cta ggc ctc agc gag	432
Ala Ile Arg Tyr Ile Gly His Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Ser Glu	
130 135 140	
gag agt ctc cag cgc cgg tgc cgg cag cgc ggt gac gcg ggg tcc cct	480
Glu Ser Leu Gln Arg Arg Cys Arg Gln Arg Gly Asp Ala Gly Ser Pro	
145 150 155 160	
cgg ggc tgc ccg ctg tgc ccc gac gac tgc ccc gcg cag atg cag aca	528
Arg Gly Cys Pro Leu Cys Pro Asp Asp Cys Pro Ala Gln Met Gln Thr	
165 170 175	
cgg acg cag gct gag ggg cag ggg cag ggg cgc ggg ctg ggc ctg gta	576
Arg Thr Gln Ala Glu Gly Gln Gly Gln Gly Arg Gly Leu Gly Leu Val	
180 185 190	
tcc gcc gtc cgc gcc ggg gcg tcc tgg gga tcc ccg cct gcc tgc ccc	624
Ser Ala Val Arg Ala Gly Ala Ser Trp Gly Ser Pro Pro Ala Cys Pro	
195 200 205	
gga gcc cga gct gca ccc gag ccg cgc gac ccg cct gcg ctg ttc gcc	672
Gly Ala Arg Ala Ala Pro Glu Pro Arg Asp Pro Pro Ala Leu Phe Ala	
210 215 220	
gag gcg gcg tgc cct gaa ggg cag gcg atg gag cca agc cca ccg tcc	720
Glu Ala Ala Cys Pro Glu Gly Gln Ala Met Glu Pro Ser Pro Pro Ser	
225 230 235 240	

ccg ctc ctt ccg ggc gac gtg ctg gct ctg ttg gag acc tgg atg ccc 768
 Pro Leu Leu Pro Gly Asp Val Leu Ala Leu Leu Glu Thr Trp Met Pro
 245 250 255

ctc tcg cct ctg gag tgg ctg cct gag gag ccc aag 804
 Leu Ser Pro Leu Glu Trp Leu Pro Glu Glu Pro Lys
 260 265

<210> 63

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu
 1 5 10 15

Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe
 20 25 30

Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg
 35 40 45

Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His
 50 55 60

Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly
 65 70 75 80

Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys
 100 105 110

Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val
 115 120 125

Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala
 130 135 140

Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160

Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys
 165 170 175

Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu
 180 185 190

Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg
 195 200 205

Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg
 210

<210> 64

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(648)

<400> 64

atg ggc agc ccc cgc tcc gcg ctg agc tgc ctg ctg ttg cac ttg ctg 48
 Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu
 1 5 10 15

gtc ctc tgc ctc caa gcc cag gta act gtt cag tcc tca cct aat ttt 96
 Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe
 20 25 30

aca cag cat gtg agg gag cag agc ctg gtg acg gat cag ctc agc cgc 144

Thr	Gln	His	Val	Arg	Glu	Gln	Ser	Leu	Val	Thr	Asp	Gln	Leu	Ser	Arg	
	35						40					45				
cgc	ctc	atc	cgg	acc	tac	caa	ctc	tac	agc	cgc	acc	agc	ggg	aag	cac	192
Arg	Leu	Ile	Arg	Thr	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Ser	Arg	Thr	Ser	Gly	Lys	His	
	50					55					60					
gtg	cag	gtc	ctg	gcc	aac	aag	cgc	atc	aac	gcc	atg	gca	gag	gac	ggc	240
Val	Gln	Val	Leu	Ala	Asn	Lys	Arg	Ile	Asn	Ala	Met	Ala	Glu	Asp	Gly	
	65				70				75						80	
gac	ccc	ttc	gca	aag	ctc	atc	gtg	gag	acg	gac	acc	ttt	gga	agc	aga	288
Asp	Pro	Phe	Ala	Lys	Leu	Ile	Val	Glu	Thr	Asp	Thr	Phe	Gly	Ser	Arg	
				85					90					95		
gtt	cga	gtc	cga	gga	gcc	gag	acg	ggc	ctc	tac	atc	tgc	atg	aac	aag	336
Val	Arg	Val	Arg	Gly	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Met	Asn	Lys	
				100				105						110		
aag	ggg	aag	ctg	atc	gcc	aag	agc	aac	ggc	aaa	ggc	aag	gac	tgc	gtc	384
Lys	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Lys	Ser	Asn	Gly	Lys	Gly	Lys	Asp	Cys	Val	
		115					120						125			
ttc	acg	gag	att	gtg	ctg	gag	aac	aac	tac	aca	gcg	ctg	cag	aat	gcc	432
Phe	Thr	Glu	Ile	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ala	Leu	Gln	Asn	Ala	
		130					135					140				
aag	tac	gag	ggc	tgg	tac	atg	gcc	ttc	acc	cgc	aag	ggc	cgg	ccc	cgc	480
Lys	Tyr	Glu	Gly	Trp	Tyr	Met	Ala	Phe	Thr	Arg	Lys	Gly	Arg	Pro	Arg	
	145				150					155					160	
aag	ggc	tcc	aag	acg	cgg	cag	cac	cag	cgt	gag	gtc	cac	ttc	atg	aag	528
Lys	Gly	Ser	Lys	Thr	Arg	Gln	His	Gln	Arg	Glu	Val	His	Phe	Met	Lys	
			165					170					175			
cgg	ctg	ccc	cgg	ggc	cac	cac	acc	acc	gag	cag	agc	ctg	cgc	ttc	gag	576

Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu
 180 185 190

ttc ctc aac tac ccg ccc ttc acg cgc agc ctg cgc ggc agc cag agg 624
 Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg
 195 200 205

act tgg gcc ccg gaa ccc cga 645
 Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg
 210 215

<210> 65

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly
 20 25 30

Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg
 35 40 45

Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val
 50 55 60

Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val
 65 70 75 80

Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn
 85 90 95

Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala
 100 105 110

Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu
 115 120 125

Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys
 130 135 140

Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu
 145 150 155 160

Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln
 165 170 175

Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp
 180 185 190

Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn
 195 200 205

Arg Ala His Trp
 210

<210> 66

<211> 636

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(639)

<400> 66

atg gat tat ttg ctc atg att ttc tct ctg ctg ttt gtg gct tgc caa 48
 Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln
 1 5 10 15

gga gct cca gaa aca gca gtc tta ggc gct gag ctc agc gcg gtg ggt 96
 Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly
 20 25 30

gag aac ggc ggg gag aaa ccc act ccc agt cca ccc tgg cgg ctc cgc	144
Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg	
35 40 45	
cgg tcc aag cgc tgc tcc tgc tgc tcc ctg atg gat aaa gag tgt gtc	192
Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val	
50 55 60	
tac ttc tgc cac ctg gac atc att tgg gtc aac act ccc gag cac gtt	240
Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val	
65 70 75 80	
gtt ccg tat gga ctt gga agc cct agg tcc aag aga gcc ttg gag aat	288
Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn	
85 90 95	
tta ctt ccc aca aag gca aca gac cgt gag aat aga tgc caa tgt gct	336
Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala	
100 105 110	
agc caa aaa gac aag aag tgc tgg aat ttt tgc caa gca gga aaa gaa	384
Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu	
115 120 125	
ctc agg gct gaa gac att atg gag aaa gac tgg aat aat cat aag aaa	432
Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys	
130 135 140	
gga aaa gac tgt tcc aag ctt ggg aaa aag tgt att tat cag cag tta	480
Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu	
145 150 155 160	
gtg aga gga aga aaa atc aga aga agt tca gag gaa cac cta aga caa	528
Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln	
165 170 175	

acc agg tcg gag acc atg aga aac agc gtc aaa tca tct ttt cat gat 576
 Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp
 180 185 190

ccc aag ctg aaa ggc aag ccc tcc aga gag cgt tat gtg acc cac aac 624
 Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn
 195 200 205

cga gca cat tgg 636
 Arg Ala His Trp
 210

<210> 67

<211> 143

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Met Gln His Arg Gly Phe Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Gly
 20 25 30

Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Ala Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser
 35 40 45

Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln
 50 55 60

Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe
 65 70 75 80

Gly Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly Ala Cys Asp Gly
 85 90 95

Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Tyr
 100 105 110

Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro Cys Thr Pro
 115 120 125

Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly Lys Asp
 130 135 140

<210> 68

<211> 429

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(432)

<400> 68

atg cag cac cga ggc ttc ctc ctc ctc acc ctc ctc gcc ctg ctg gcg 48
 Met Gln His Arg Gly Phe Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

ctc acc tcc gcg gtc gcc aaa aag aaa gat aag gtg aag aag ggc ggc 96
 Leu Thr Ser Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Gly
 20 25 30

ccg ggg agc gag tgc gct gag tgg gcc tgg ggg ccc tgc acc ccc agc 144
 Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Ala Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser
 35 40 45

agc aag gat tgc ggc gtg ggt ttc cgc gag ggc acc tgc ggg gcc cag 192
 Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln
 50 55 60

acc cag cgc atc cgg tgc agg gtg ccc tgc aac tgg aag aag gag ttt 240
 Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe
 65 70 75 80

gga gcc gac tgc aag tac aag ttt gag aac tgg ggt gcg tgt gat ggg 288
 Gly Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly Ala Cys Asp Gly

	85	90	95	
ggc aca ggc acc aaa gtc cgc caa ggc acc ctg aag aag gcg cgc tac				336
Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Tyr				
	100	105	110	
aat gct cag tgc cag gag acc atc cgc gtc acc aag ccc tgc acc ccc				384
Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro Cys Thr Pro				
	115	120	125	
aag acc aaa gca aag gcc aaa gcc aag aaa ggg aag gga aag gac				429
Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly Lys Asp				
	130	135	140	
<210> 69				
<211> 408				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 69				
Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val				
1 5 10 15				
Leu Leu Gly Gly Ala Ser His Ala Ser Leu Ile Pro Glu Thr Gly Lys				
20 25 30				
Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly				
35 40 45				
Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met				
50 55 60				
Phe Gly Leu Arg Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro				
65 70 75 80				
Asp Tyr Met Arg Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu Glu				
85 90 95				

Glu Gln Ile His Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala Ser
100 105 110

Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu His Leu Glu Asn
115 120 125

Ile Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu
130 135 140

Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Ala Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu
145 150 155 160

Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His
165 170 175

Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro
180 185 190

Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn
195 200 205

Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp
210 215 220

Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His
225 230 235 240

Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg
245 250 255

Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu
260 265 270

Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg
275 280 285

Arg Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys
 290 295 300

Asn Lys Asn Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val
 305 310 315 320

Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr
 325 330 335

Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr
 340 345 350

Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile
 355 360 365

Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu
 370 375 380

Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met
 385 390 395 400

Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg
 405

<210> 70

<211> 1224

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1227)

<400> 70

atg att cct ggt aac cga atg ctg atg gtc gtt tta tta tgc caa gtc 48
 Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val
 1 5 10 15

ctg cta gga ggc gcg agc cat gct agt ttg ata cct gag acg ggg aag 96

Leu Leu Gly Gly Ala Ser His Ala Ser Leu Ile Pro Glu Thr Gly Lys
 20 25 30

aaa aaa gtc gcc gag att cag ggc cac gcg gga gga cgc cgc tca ggg 144
 Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly
 35 40 45

cag agc cat gag ctc ctg cgg gac ttc gag gcg aca ctt ctg cag atg 192
 Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met
 50 55 60

ttt ggg ctg cgc cgc cgc ccg cag cct agc aag agt gcc gtc att ccg 240
 Phe Gly Leu Arg Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro
 65 70 75 80

gac tac atg cgg gat ctt tac cgg ctt cag tct ggg gag gag gag gaa 288
 Asp Tyr Met Arg Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu Glu
 85 90 95

gag cag atc cac agc act ggt ctt gag tat cct gag cgc ccg gcc agc 336
 Glu Gln Ile His Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala Ser
 100 105 110

cgg gcc aac acc gtg agg agc ttc cac cac gaa gaa cat ctg gag aac 384
 Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu His Leu Glu Asn
 115 120 125

atc cca ggg acc agt gaa aac tct gct ttt cgt ttc ctc ttt aac ctc 432
 Ile Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu
 130 135 140

agc agc atc cct gag aac gag gcg atc tcc tct gca gag ctt cgg ctc 480
 Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Ala Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu
 145 150 155 160

ttc cgg gag cag gtg gac cag ggc cct gat tgg gaa agg ggc ttc cac 528

Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His
 165 170 175

cgt ata aac att tat gag gtt atg aag ccc cca gca gaa gtg gtg cct 576
 Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro
 180 185 190

ggg cac ctc atc aca cga cta ctg gac acg aga ctg gtc cac cac aat 624
 Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn
 195 200 205

gtg aca cgg tgg gaa act ttt gat gtg agc cct gcg gtc ctt cgc tgg 672
 Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp
 210 215 220

acc cgg gag aag cag cca aac tat ggg cta gcc att gag gtg act cac 720
 Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His
 225 230 235 240

ctc cat cag act cgg acc cac cag ggc cag cat gtc agg att agc cga 768
 Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg
 245 250 255

tcg tta cct caa ggg agt ggg aat tgg gcc cag ctc cgg ccc ctc ctg 816
 Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu
 260 265 270

gtc acc ttt ggc cat gat ggc cgg ggc cat gcc ttg acc cga cgc cgg 864
 Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg
 275 280 285

agg gcc aag cgt agc cct aag cat cac tca cag cgg gcc agg aag aag 912
 Arg Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys
 290 295 300

aat aag aac tgc cgg cgc cac tcg ctc tat gtg gac ttc agc gat gtg 960

Asn	Lys	Asn	Cys	Arg	Arg	His	Ser	Leu	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Val	
305						310				315					320	
ggc	tgg	aat	gac	tgg	att	gtg	gcc	cca	cca	ggc	tac	cag	gcc	ttc	tac	1008
Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Ile	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	Ala	Phe	Tyr	
				325					330					335		
tgc	cat	ggg	gac	tgc	ccc	ttt	cca	ctg	gct	gac	cac	ctc	aac	tca	acc	1056
Cys	His	Gly	Asp	Cys	Pro	Phe	Pro	Leu	Ala	Asp	His	Leu	Asn	Ser	Thr	
			340					345					350			
aac	cat	gcc	att	gtg	cag	acc	ctg	gtc	aat	tct	gtc	aat	tcc	agt	atc	1104
Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	
		355					360					365				
ccc	aaa	gcc	tgt	tgt	gtg	ccc	act	gaa	ctg	agt	gcc	atc	tcc	atg	ctg	1152
Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Met	Leu	
	370					375					380					
tac	ctg	gat	gag	tat	gat	aag	gtg	gta	ctg	aaa	aat	tat	cag	gag	atg	1200
Tyr	Leu	Asp	Glu	Tyr	Asp	Lys	Val	Val	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gln	Glu	Met	
385					390				395						400	
gta	gta	gag	gga	tgt	ggg	tgc	cgc									1224
Val	Val	Glu	Gly	Cys	Gly	Cys	Arg									
				405												
<210> 71																
<211> 24																
<212> DNA																
<213> Artificial Sequence																
<400> 71																
gccccgcgctc caactgctct gatg																
24																

<210>	72
<211>	24
<212>	DNA

<213> Artificial Sequence
<400> 72
tgcctacggt ggtgcgccct ctgc 24

<210> 73
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 73
gaagcgcaac agggccatca cg 22

<210> 74
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 74
ccacgtcacg caggtcccg ttc 22

<210> 75
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 75
gatcctgttc tctgcctctg ga 22

<210> 76
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 76
tcacccactt tgcaccccg ag 22

<210> 77
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 77
ttcctcgtct tggccttttg g 21

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 78
gctggatctt cgtaggctcc g 21

<210> 79
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 79
ggcaagctga ccctgaagt 19

<210> 80
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 80
gggtgctcag gtagtggtt 19

出願人又は代理人の書類記号 1217WO3	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

REC'D 19 JAN 2001

WIPO PCT

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

_____ 14 _____ 頁、 _____ 6 _____ 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

寄託の日付

22.02.00

受託番号

FERM BP-7043

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

— 受理官庁記入欄 —

☒ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

新田 稔

— 国際事務局記入欄 —

☒ この用紙が国際事務局に受理された日

19 JAN 2001

権限のある職員

田口 正史

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09323

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06, A61P 9/04// A61K 38/18, C12N 15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06, A61P 9/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Makino, S. et al., "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro", J. Clin. Invest. (March, 1999) Vol.103, No.5, pp.697-705	1-6, 8-91
X	Keichi FUKUDA, "Kotsuzui Saibou kara no Shinkin Saibou no Yuudo", HUMAN CELL (September, 1999) Vol.12, No.3, pp.159-162	1-6, 8-91
X	Guan, K. et al., "Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro", Cytotechnology (May, 1999) Vol.30, Nos.1-3, pp.211-226	7-18, 23, 24
X	Kolossov, E. et al., "Functional characteristics of ES cell-derived Cardiac Precursor Cells Identified by Tissue-specific Expression of the Green Fluorescent Protein" J. Cell Biol. (1998) Vol.143, No.7, pp.2045-2056	7-18, 23, 24
P, X	Xiaoxia, G. et al., "Properties and applications of embryonic stem cells" Chinese Science Bulletin (July, 2000) Vol.45, No.14, pp.1258-1265	7-18, 23, 24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 March, 2001 (29.03.01)	Date of mailing of the international search report 17 April, 2001 (17.04.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06,
A61P 9/04// A61K 38/18, C12N 15/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/06, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/02, A61K 35/28, A61K 35/44, A61P 9/06,
A61P 9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Makino, S. et al., "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells <i>in vitro</i> ", J. Clin. Invest. (March, 1999) Vol. 103, No. 5, p. 697-705	1-6, 8-91
X	福田恵一, "骨髓細胞からの心筋細胞の誘導", HUMAN CELL (Sept. 1999) Vol. 12, No. 3, p. 159-162	1-6, 8-91

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.03.01

国際調査報告の発送日

17.04.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Guan, K. et al., "Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation <i>in vitro</i> ", Cytotechnology (May, 1999) Vol. 30, No. 1-3, p. 211-226	7-18, 23, 24
X	Kolossov, E. et al., "Functional characteristics of ES cell-derived Cardiac Precursor Cells Identified by Tissue-specific Expression of the Green Fluorescent Protein" J. Cell Biol. (1998) Vol. 143, No. 7, p. 2045-2056	7-18, 23, 24
P, X	Xiaoxia, G. et al., "Properties and applications of embryonic stem cells" Chinese Science Bulletin (July, 2000) Vol. 45, No. 14, p. 1258-1265	7-18, 23, 24